

***Frühwirkungen genotoxischer und nichtgenotoxischer
Kanzerogene (Fluorene) auf die Zellteilung verschiedener
‘Nicht - Targetgewebe’ bei jungen männlichen Ratten***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich – Schiller – Universität Jena

von Sascha Nikolov
geboren am 13.12.1973 in Karl-Marx-Stadt; j. Chemnitz

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. M. Danz (Betreuer),
Institut für Anatomie I des Klinikums der FSU – Jena
2. Prof. Dr. med. G. Raabe,
Institut für Pathologie des Klinikums der FSU - Jena
3. MR Doz. Dr. med. habil. H. Urban,
Institut für Pathologie am Waldklinikum Gera gGmbH

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01. Oktober 2002

Vorwort

An dieser Stelle ist es mir ein Bedürfnis, mich bei all jenen zu bedanken, die mich bei der Erstellung der Dissertationsarbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank natürlich meinem Mentor Herrn Prof. Dr. med. habil. M. Danz für die Überlassung des Themas und die zuverlässige und motivierende Betreuung über die gesamte Zeit hinweg. Den medizinisch-technischen Assistentinnen der Institute für Anatomie und Pathologie der FSU-Jena danke ich für die Herstellung der histologischen Präparate.

Ebenso gilt mein Dank den wissenschaftlichen Vorarbeitern Herrn Dr. med. H. Blaszyk, Herrn Dr. med. A. Hartmann und Frau Dr. med. C. Kempe für die Einführung in das Themengebiet.

Nicht zu vergessen sind meine Familie, meine Eltern, Schwiegereltern und Herrn Bernhard Liesegang - auch bei ihnen möchte ich mich hiermit herzlich bedanken.

Verzeichnis der Abkürzungen

AAF	-	2-Acetylaminofluoren
ACTH	-	Adrenocorticotropes Hormon
BF	-	Blockadefaktor
BNF	-	Beta-Naphtoflavon
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNS	-	Desoxyribonucleinsäure
EGF	-	Epidermal Growth Factor
FEN	-	Fluoren
FON	-	Fluorenon
GCT	-	Granulated Convoluted Tubules
GH	-	Growth Hormone
GIT	-	Gastro-Intestinal-Trakt
GSM	-	Glandula submandibularis
HGF	-	Hepatocyte Growth Factor
IGF	-	Insulin-like Growth Factor
KG	-	Körpergewicht
MI	-	Mitoseindex
MZ	-	Mitosezahl
NGF	-	Nerve Growth Factor
NN	-	Nebenniere
NNR	-	Nebennierenrinde
OP	-	Operation
PAT	-	Promoting Activity Test
PCB	-	polychlorierte Biphenyle
PB	-	Phenobarbital
POMC	-	Proopiomelanocortin
SOP	-	Scheinoperation
TGF	-	Transforming Growth Factor
ZF	-	Zona fasciculata
ZG	-	Zona glomerulosa

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Allgemeine Anmerkungen zur Kanzerogenese	1
1.2.	Speicheldrüsen im endokrinen Kontext	4
1.3.	Metaphase-Arrest-Technik	6
2.	Aufgabenstellung	7
3.	Material und Methode	8
3.1.	Versuchstiere	8
3.2.	Substanzen und Applikation	9
3.3.	Relative Körpergewichte	9
3.4.	Relative Organgewichte	10
3.5.	Histologische Präparation und Auswertung	10
3.5.1.	Mitoseindex der Drüsenmägen	11
3.5.2.	Mitosezahl der Nebennieren	11
3.5.3.	Mitoseindices der Gll. submandibulares	11
3.5.4.	Mitoseindex der Pars intermedia der Hypophyse	11
3.6 .	Biostatistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse	12
4.	Ergebnisse	
4.1.	Kurzzeiteffekte von Fluorenon	16
4.1.1.	Körper- und Organgewichte	17
4.1.2.	Mitosezahlen in der Nebennierenrinde	18
4.1.3.	Mitoseindex der Drüsenmägen	20
4.1.4.	Zellteilung in den Gll. submandibulares	21
4.2.	Kurzzeitwirkung (48 h) von AAF und Reserpin	22
4.2.1.	Körper- und Organgewichte	22
4.2.2.	Mitosen in der NNR	23
4.2.3.	Mitosen in der Pars intermedia der Hypophyse	25
4.3.	Kurzzeitwirkung (48 h) von Fluoren und AAF	28
4.3.1.	Körper- und Organgewichte	28

4.3.2. NNR-Mitosen	29
4.4. Mitosen im Drüsenmagen nach Sialadenektomie, Scheinoperation sowie nach AAF kombiniert mit Beta-Naphtoflavon	32
4.4.1. Körper- und Organgewichte	32
4.4.2. Mitoseindex der Drüsenmägen	34
5. Diskussion	
5.1. Anmerkungen zur Versuchsdurchführung	35
5.2. Fluorenderivate und deren Metabolisierung	36
5.3. Systemische Wirkungen von Fluorenderivaten im Kurzzeittest	38
5.4. Mögliche regulative Einflüsse der Gll. submandibulares auf Wachstums- bzw. Differenzierungsprozesse	40
5.5. Physiologische und stimulierte Proliferation der NNR	45
5.6. Einflüsse von Vincristin und Colchizin	48
6. Zusammenfassung	51
7. Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Anmerkungen zur Kanzerogenese

Die Geschichte der Medizin lehrt, daß man die Pathogenese einer Erkrankung verstehen muß, bevor wirkungsvolle, kausale therapeutische Ansätze entwickelt werden können. Mitte des 19. Jahrhunderts postulierte Virchow charakteristische anatomisch-morphologische Kriterien der Krankheiten. Später entdeckte Koch das Tuberkelbakterium und zeigte, daß bestimmte Erkrankungen durch Mikroorganismen hervorgerufen werden. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wiesen Banting, Best u.a. nach, daß Erkrankungen auch in endokrin-metabolischen Dysfunktionen begründet sind. Dies führte zur Entdeckung des Insulins und zum besseren Verständnis der Wirkungen von Hormonen, Vitaminen und Spurenelementen.

Forschungen der letzten Jahrzehnte ergaben, daß eine Vielzahl von Erkrankungen, vor allem maligne Tumoren, auf molekulargenetischer Ebene gebahnt werden (Curt 1996). Dieser als Kanzerogenese beschriebene Prozeß ist langfristig und läuft mehrstufig ab. Er vollzieht sich nach bestimmten Gesetzmäßigkeiten als Reaktion auf einen kritischen genotoxischen Initialschaden. Dafür sprechen hohe Mutationsfrequenz in Tumorzellen, erhöhte Tumorzinzidenz im höheren Lebensalter bei erhöhter Spontanmutationsrate und verringertes DNS-Reparaturpotential (Trosko und Chang 1978). Das allgemein anerkannte 3-Stufen-Modell der Kanzerogenese, in dem neben anfänglichen Genomschäden zunehmend auch epigenetische Einflüsse berücksichtigt werden, umfaßt in abstrakter Form drei Phasen und scheint der Realität am nächsten zu kommen :

Initiation

- genotoxische Veränderungen durch kovalente Wechselwirkungen mit der DNS (exogen, endogene Ursachen, Spontanmutationen)
- Dosisunabhängigkeit (Butterworth et al. 1999)
- genetische Fixierung des Initialschadens (Barrett et al. 1987)
- Irreversibilität

Promotion

- selektive klonale Expansion initiiertter Zellen
- Voraussetzung: kontinuierliches Einwirken von Promotoren
- grundsätzlich reversibel, d.h. „Remodelling“ präneoplastischer Veränderungen nach Promotorentzug möglich (durch apoptotischen Untergang der alterierten Zelllinien bedingt; Pitot et al. 1995)
- Schwellenwertcharakteristik und exponentielle Dosis-Wirkungs-Beziehungen
- Spezies-, Stammes- bzw. Gewebsspezifität
- morphologisch und immunhistochemisch nachweisbare Gewebshypertrophien/-hyperplasien und Enzyminduktionen
- zeitlich längster Abschnitt der Kanzerogenese (Jahre bis Jahrzehnte)

Progression

- unscharfe Grenze zur Promotion
- zunehmende karyotypische Instabilität
- Wachstumsautonomie
- Expression maligner Eigenschaften (Wachstum, Infiltration, Destruktion, Metastasierung)

Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die über den initialen Schaden nach zeitlicher Latenz zum manifesten Tumor führen, sind weiterhin nahezu unbekannt. Nicht zuletzt ist das auch Ausdruck fehlender zuverlässiger diagnostischer Merkmale während der Krebsentwicklung. Die lange Dauer, die die Induktion maligner Tumoren selbst im Experiment benötigt, hat dazu geführt, nach Frühwirkungen tumor erzeugender (kanzerogener) Substanzen zu fahnden. Der diagnostische Endpunkt wären Veränderungen, die frühzeitig nach Exposition auftreten und auf den kanzerogenen Prozeß hinweisen.

Unter dieser Zielstellung forderte die WHO schon 1969 die Entwicklung von Kurzzeittests, um chemische Stoffe mit kanzerogenem Potential schneller zu identifizieren. Während der letzten 30 Jahre wurden zahlreiche Testsysteme entwickelt (z.B. Salmonella/microsome-assay, insect mutations-assay, E.coli-mutations-assay, DNA-damage measuring, sister chromatid exchange-assay u.a.m.). Damit können in vitro mutagene Wirkungen von Testsubstanzen an

Zellkulturen oder Mikroorganismen nachgewiesen werden (Ashby et al. 1985; Pool und Schmaehl 1987). Da sich aber kein direkter Zusammenhang zwischen Mutagenität und Kanzerogenität nachweisen ließ (Ashby 1989, Travis et al. 1990), sind diese experimentellen Tests in ihrer Treffsicherheit eingeschränkt. Zudem lassen sich mit Zellkulturen oder einzelligen Lebewesen die physiologischen Verhältnisse komplexer Organismen nur partiell simulieren.

Kanzerogene Stoffe kann man dem Angriffspunkt nach in genotoxische und nicht-genotoxische Wirkstoffgruppen unterteilen. Genotoxische Xenobiotika führen zu Alterationen an der DNS, meist in Form direkter kovalenter Bindungen oder über elektrophile Stoffwechselintermediärprodukte (Barrett 1986). Nichtgenotoxische Kanzerogene wirken über sekundäre Mechanismen, die weitgehend unbekannt sind. Ein weiterer Unterschied zwischen genotoxischen und nichtgenotoxischen Kanzerogenen ist, daß erstere in nicht zytotoxischen (nekrogenen) Dosisbereichen eine Mitoinhibition im sogenannten Targetgewebe verursachen. Im Gegensatz dazu wirken nichtgenotoxische Kanzerogene (Promotoren) primär mitogen, d.h. in Form additiver Zellvermehrung (Holme et al. 1986; Butterworth 1989, 1991; Clayson et al. 1989; Jones et al. 1996; Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung kanzerogener Xenobiotika in Wirkgruppen

Substanzkategorie	Genotoxizität	Zytotoxizität	Initiation	Promotion
I Solitäre oder komplette Kanzerogene	+ / -	+	+	+
II Primäre Mitogene (Promotoren : PB, PCB)	-	-	-	+
III Sekundäre Mitogene (restitutive Regeneration)				
a) zytotoxische Substanzen	+ / -	+	+ / -	+
b) operative Gewebsentfernung (z.B. partielle Hepatektomie)	-	-	-	+

In der Literatur wird zur Zeit den nichtgenotoxischen Kanzerogenen die größere Bedeutung unter natürlichen Bedingungen eingeräumt (Ashby 1989; Butterworth 1989, 1990). Von der Überlegung ausgehend, daß Einflüsse der Testsubstanzen auf das Proliferationsverhalten verschiedener Gewebe Merkmale zur Identifi-

zierung möglicher kanzerogener Wirkungen sein könnten, fanden Danz et al. in den 1970er Jahren als Nebeneffekt kurz nach Kanzerogengabe eine erhöhte Proliferation der Nebennierenrinde (Promoting-Activity-Test, PAT- Danz et al. 1978a; Danz und Urban 1980). Aufgrund der proliferogenen Wirkung des Blutserums AAF-behandelter Tiere bei Serumempfängern vermuteten die Autoren, daß endogene Wachstumsfaktoren als Mediatoren der passageren additiven adrenokortikalen Mitogenese wirken könnten (Bräuer et al. 1980; Danz et al. 1978c; Danz und Bolck 1980; Danz und Bräuer 1988). Überdies fanden sich nach AAF zytotoxische Schäden in den Granulated Convuluted Tubules (GCT) der Gll. submandibulares (Danz et al. 1997). Die genannten akuten Wirkungen an NN und Speicheldrüsen sind aus folgenden Gründen erwähnenswert :

- erstens, sowohl die NNR als auch die Speicheldrüsen sind in chronischen Kanzerogeneseversuchen gegenüber der eigentlichen tumorigenen Wirkung von Xenobiotika weitgehend insensitiv ;
- zweitens, die selektiven zytotoxischen Effekte des hepatokanzerogenen AAF sind ein Hinweis auf Funktionen der Speicheldrüsen in Metabolisierung und Exkretion von Fremdstoffen
- drittens, die Gll. submandibulares von Nagern unterliegen einer vielfältigen hormonellen Regulation und bilden verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren; durch ihre Einbindung in adaptive und metabolische Reaktionen des Organismus auf Xenobiotika haben sie zunehmend wissenschaftliches Interesse gefunden.

1.2. Speicheldrüsen im endokrinen Kontext

1986 erhielten Montalcini und Cohen den Nobelpreis für Medizin. Montalcini gelang es bereits 1956, aus Schlangengift ein auf Ganglienzellen wachstumsstimulierendes Protein zu isolieren, das heute als Nerve Growth Factor (NGF) bekannt ist. Da Schlangengift in einer den Speicheldrüsen ähnlichen Drüse gebildet wird, kam Cohen auf die Idee, Speicheldrüsen von Säugern näher zu untersuchen. Und tatsächlich fand sich bei Mäusen eine um ein Vielfaches höhere Konzentration von NGF (zitiert nach Hamburger 1993). Somit war bewiesen, daß die Speicheldrüsen neben der Speichelsekretion auch endokrine Funktionen erfüllen. Die Entdeckung weiterer endogener Wachstums- und

Differenzierungsfaktoren wie z.B. EGF (Cohen 1960), TGF, HGF, IGF und vieler anderer funktioneller Proteine folgte (vgl. Gresik et al. 1996; Amano et al. 2001). Dabei variiert bei verschiedenen Tierspezies die anteilmäßige Rolle der einzelnen Kopfspeicheldrüsen bei der Bildung dieser Faktoren erheblich. Während beim Menschen die Gl. parotis Hauptbildungsstätte regulativer Peptide zu sein scheint (Ino et al. 1990), dominiert bei Nagern die Gl. submandibularis (Theslaeff et al. 1988).

Man geht davon aus, daß die in ihnen gebildeten Faktoren systemische Wirkungen haben und für die Integrität gastro-intestinalen Schleimhautepithels bedeutsam sind (Hiramatsu 1990; Kasugai 1996; Rao 1997; Sarosiek et al. 2000). Für letzteres spricht, daß erniedrigte Speichel-EGF-Konzentrationen mit verzögerter Heilung gastro-intestinaler Läsionen einhergingen (Ino 1990; Rao 1997). Die Zusammensetzung des Speichels einschließlich seines Gehaltes an Hormonen und Wachstumsfaktoren wird durch Alter, Geschlecht, Tageszeit, Nahrungsaufnahme und hormonelle Regelkreise (Thyroxin, Geschlechtshormone, Kortikoide, ACTH) bestimmt (Koerker 1967; Arancibia et al. 1985; Theslaeff 1988; Abb. 22). Andererseits führt eine Sialadenektomie zu Involutionerscheinungen in Schilddrüse, Gonaden, Nebennieren und Thymus (Kakizaki et al. 1976; Dean et al. 1984). Die Einbindung der Kopfspeicheldrüsen in endokrine Regulationen zeigt sich auch in funktionellen Störungen, die bei den Sialadenosen zwischen Schilddrüse, Gonaden, Pancreas, Zirbeldrüse und vegetativem Nervensystem beobachtet werden (Donath 1976).

Aus den o.g. zytotoxischen Schäden an Speichelgängen durch AAF ergeben sich weitere Aspekte im Sinne systemischer Wirkungen : Speicheldrüsen könnten allgemein in Metabolismus und Exkretion von Xenobiotika bzw. deren Metaboliten einbezogen sein, wodurch ihre endokrinen Funktionen beeinflußt werden, wenn- gleich weniger dramatisch als nach AAF (Danz et al. 1999). Zu diesem Zwecke wurde in vorliegender Arbeit sowohl das strukturanaloge Fluorenol (FON), das als nichtgenotoxisches Hepatokarzinogen bekannt ist, als auch die Auswirkung einer Sialadenektomie auf die Zellproliferation gastralen Schleimhautepithels untersucht.

1.3. Metaphase-Arrest-Technik

Eine probate Methode zur Beurteilung des proliferativen Verhaltens ist die lichtmikroskopische Auszählung der Mitosen. Selbst bei malignen Tumoren hat sie sich als eines der zuverlässigsten Prognosekriterien erwiesen. Wenn man die notwendige Erfahrung voraussetzt, handelt es sich um das älteste, schnellste und billigste Verfahren, das Teilungswachstum eines Gewebes zu beurteilen (Baak 1990). Zur besseren Vergleichbarkeit hat es sich durchgesetzt, die absolute Mitosezahl als Mitoseindex (MI: Verhältnis der Zahl der Kernteilungsfiguren zur Zahl aller Kerne) anzugeben. Ein weniger exakter, jedoch akzeptierter Parameter ist die Bestimmung der Mitosezahl pro Einheitsfläche eines Gewebeschnittes. Besonders bei Geweben mit geringer Proliferationsrate ist die Metaphase-Arrest-Technik hilfreich, da mit ihr die leichter erkennbaren blockierten Metaphasen über einen gewissen Zeitraum hinweg akkumulieren (Wright und Appleton 1980). Dies erlaubt gewisse Aussagen zur Proliferationsrate, d.h. zur Zahl der pro Zeiteinheit in die Mitose eintretenden Zellen. Durch die Persistenz des Metaphasen-zustandes während der Wirkungszeit des Blockers erhöht sich die Anzahl der erfaßbaren Mitosen um einen von der Dauer der Blockade und der Mitosedauer der Zellen (ca. 1 Stunde) abhängigen Faktor (im weiteren als Blockadefaktor BF bezeichnet). Auf diese Weise werden mehr Mitosen gezählt als tatsächlich zum Zeitpunkt der Tötung des Tieres in Gang waren. Bei gleicher Dosierung, Applikation und Wirkdauer der blockierenden Substanz sind auch verschiedene Versuche bis zu einem gewissen Grad miteinander vergleichbar.

Wir verwendeten die gebräuchlichen Metaphasenblocker Vincristin und Colchizin, die die Arretierung der Metaphasen in pharmakologisch unterschiedlicher Weise bewirken (Hamel 1996). Da die Zellvermehrung unter physiologischen Bedingungen chronobiologischen Einflüssen unterliegt, wurde am Beispiel von Vincristin auch geprüft, ob seine Effizienz in verschiedenen zirkadianen Phasen unterschiedlich ist.

2. Aufgabenstellung

Vorliegende Untersuchungen sind Teil eines Versuchsprogramms, in dem akute proliferogene Wirkungen von genotoxischen und nichtgenotoxischen Kanzerogenen an Ratten untersucht werden. Mit dem PAT wurde eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher chemischer Stoffe (z.B. kanzerogene und nichtkanzerogene Fluorenderivate) getestet. Neben dem klassischen Leberkanzerogen AAF waren auch FEN und FON im PAT positiv. In einem mittelfristigen Initiations-Promotions-Experiment bestätigte sich die tumorpromotorische Wirkung beider Verbindungen an der Leber (Blaszyk und Hartmann 1991; Danz et al. 1991).

Auf diesen Ergebnissen basierend suchten wir weitere Effekte, die als lokale und / oder systemische Wirkungen der Kanzerogene zu betrachten bzw. als sekundäre endogene Reaktionen zu erklären sind.

- Es ist allgemein bekannt, daß genotoxische Kanzerogene in ihrem Targetgewebe anfänglich mitosehemmend wirken, nichtgenotoxische dagegen die Zellteilungsaktivität erhöhen. Daraus wurde die Frage abgeleitet :

⇒ Sind ähnliche gegensätzliche Wirkungen auch außerhalb der Targetgewebe eines Kanzerogens nachweisbar ?

- Die Zellerneuerung der meisten Wechselgewebe der Säuger unterliegt tageszeitlichen Rhythmen.

⇒ Paßt sich die Wirkung kanzerogener Substanzen dieser Tagesrhythmik an ?

⇒ Unterscheiden sich die Wirkungen genotoxischer von denen nichtgenotoxischer Substanzen in Abhängigkeit von der Tageszeit in demselben Gewebe (Nichttargetgewebe) ?

- Vorhergehende Versuche zeigten, daß AAF zum selektiven Zelluntergang in den endokrin aktiven Granulated Convolute Tubules (GCT) der Gll. submandibulares führt (Danz et al. 1997). Experimentell sind nach Entfernung der Gll. submandibulares verzögerte Leberzellregeneration und Hemmeffekte auf die

Hepatokanzerogenese bei Ratten gefunden worden (Osipova et al. 1988; Lambotte et al. 1997). Als Ursache vermutet man die Abnahme endogener Wachstumsfaktoren. Da diese für die Integrität gastro-intestinaler Schleimhaut bedeutsam sind, stellte sich die Frage, ob

⇒ eine Sialadenektomie zu Veränderungen im Proliferationsverhalten am Drüsenmagen führt.

- Colchizin und Vincristin sind in der experimentellen Pathologie die gebräuchlichsten Metaphasenblocker.

⇒ Ist die blockierende Wirkung beider Substanzen in verschiedenen Geweben der Ratte identisch ?

⇒ Wird die blockierende Wirkung durch die Vorbehandlung mit den kanzerogenen Testsubstanzen modifiziert ?

⇒ Unterliegt die blockierende Wirkung auch zirkadianen Einflüssen ?

3. Material und Methode

Im folgenden wird ausschließlich Allgemeingültiges zu den Experimenten und zum technischen Vorgehen beschrieben. Nähere Angaben zum Versuchsablauf finden sich in den jeweiligen Ergebnisabschnitten.

3.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden ausschließlich an 8-12 Wochen alten männlichen Ratten der Stämme Han-Wist, Uje-Wist bzw. Wistar durchgeführt. Damit sollten systematische Fehler, wie z.B. modifizierende Einflüsse durch Alter oder den Ovarialzyklus der weiblichen Tiere auf die Verstoffwechselung der Xenobiotika weitgehend ausgeschlossen werden (Otto 1991, Oishi et al. 1993). Die Tiere wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU-Jena gezüchtet und in Metallkäfigen mit Plastikschalen gehalten. Standardisiertes Laborfutter (VEB KIM Altglienicke, Berlin bzw. Altromin 1316) und Trinkwasser waren frei zugänglich. Die Versuche fanden unter standardisierten Bedingungen statt, d.h. bei natürlichem Tag/Nacht - Rhythmus und einer mittleren Raumtemperatur von 20°C (Schwankungen max. 2°C). Alle Eingriffe und Behandlungsschritte an den

Tieren (OP, SOP, Behandlung, Tötung durch Desanguinierung nach Dekapitation) erfolgten ausnahmslos in Ethernarkose.

3.2. Substanzen und Applikation

Fluoren (FEN) in handelsüblicher Reinheit vom ehemaligen VEB Teerdestillation und Chemische Fabrik Erkner, Berlin, wurde von Dr. Thoß (Institut für Pathologie der FSU-Jena) gereinigt und auch zur Synthese von Fluorenon (FON) verwendet. Zur Überprüfung der Reinheit wurden spektroskopische und chromatographische Messungen, sowie Schmelzpunktbestimmungen vorgenommen. Reserpin und Colchizin überließ uns Dr. K. Splinter vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU. Beta-Naphtoflavon (BNF) und AAF bezogen wir von der Firma Serva, Heidelberg. Phenobarbital und Vincristin bezogen wir aus der Klinikums-Apotheke der FSU-Jena. Als Kontrollen wurden gänzlich unbehandelte (0-Kontrollen) oder Tiere, die nur das Lösungsmittel erhielten (Positiv-Kontrollen), untersucht.

Im Falle der Sialadenektomie dienten scheinoperierte Tiere (SOP) als Kontrollen, die der gleichen operativen Wundsetzung unterzogen wurden, jedoch ohne Entfernung des Zielorgans. Mit der Wundsetzung und der folgenden Stoffwechselreaktion (Postaggressionsstoffwechsel) sollten vergleichbare Bedingungen geschaffen werden.

Als Lösungsmittel verwendeten wir Dimethylsulfoxid (DMSO), das durch Destillation handelsüblicher Chargen gewonnen wurde.

Die Testsubstanzen wurden per Magensonde verabreicht, Reserpin und Colchizin (subkutan) sowie Vincristin (intraperitoneal) injiziert. Als Lösungsmittel für Colchizin und Vincristin benutzten wir kliniksübliche sterile 0,9-%ige NaCl-Lösung. Die Substanzdosen sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt. Die angegebenen Tageszeiten entsprechen dem Beginn der jeweiligen Sitzung, d.h. Behandlung oder Tötung.

3.3. Relative Körpergewichte

Um allgemeine Substanzwirkungen zu erfassen, wurde in allen Versuchen das Körpergewicht der Tiere sowohl zu Beginn der Behandlung als auch zum Zeitpunkt der Tötung bestimmt. Als Parameter der Veränderungen des KG errechneten wir das relative KG als Prozentsatz des initialen KG (bei Versuchsbeginn).

Die in den Tabellen angegebenen % - Werte sind das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung (a.m. \pm SD) jeder Versuchsgruppe.

3.4. Relative Organgewichte

Unmittelbar nach Versuchsende wurden den Versuchstieren Leber, Milz, Thymus, Nebennieren, teilweise auch Speicheldrüsen und die Hypophyse entnommen. Das Gewicht der Lebern wurde im unfixierten Zustand bestimmt. Milz, Thymus und Nebennieren wurden nach zweistündiger Fixation (in Bouin'scher Lösung) gewogen. Das relative Organgewicht bestimmten wir :

$$\text{rel. Organgewicht} = \frac{\text{absolutes Organgewicht}}{\text{initiales KG}}$$

- angegeben in % (z.B. Leber) bzw. ‰ (NN,Thymus)

Als Bezugsgröße wählten wir bei den Kurzzeitversuchen bewußt das initiale KG, um eine scheinbare Zunahme der Organgewichte auszuschließen, die sich zwangsläufig ergeben würde, wenn man ein behandlungsbedingt reduziertes KG als Bezugsgröße zugrunde legt. Auf die Bedeutung der Organgewichte als einfach zu bestimmenden Parameter hat bereits Stevens (1977) hingewiesen.

Das relative Thymusgewicht ist ein recht empfindlicher Indikator für unspezifische Streßreaktionen, die schon nach kurzer Zeit zur Thymolyse (Abnahme der Organmasse) führen (Selye 1973).

3.5. Histologische Präparation und Auswertung

Nach 24-stündiger Fixierung in Bouin'scher Lösung wurden Gewebeproben (Leber) bzw. komplette Organe über Histokinette® in Paraffin eingebettet. Danach wurden 6-8 µm dicke Schnittpräparate angefertigt und zur lichtmikroskopischen Auswertung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Die histologische Auswertung erfolgte sowohl nach anatomisch-pathologischen als auch nach morphometrischen Gesichtspunkten. Bei einigen Versuchen wurden exemplarisch immunhistochemische Präparate angefertigt.

3.5.1. Mitoseindex der Drüsenmägen

Die Mitosezählung erfolgte mit dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung (s. Abb. 1). Pro Tier wurden die Mitosen in zwei verschiedenen Anschnitten in jeweils zehn zufällig ausgewählten Magendrüsen gezählt. Der Mitoseindex (MI) bezieht sich auf durchschnittlich 2600-3000 ausgezählte Zellkerne pro Tier und errechnet sich folgendermaßen :

$$\text{MI (\% oder ‰)} = \frac{\text{Mitosezahl}}{\text{Summe der gezählten Ruhekerne} + \text{Mitosezahl}}$$

Um subjektive Einflüsse zu minimieren, erfolgte die Auswertung blind. D.h., das Versuchsprotokoll wurde mir erst nach der Auswertung mitgeteilt.

3.5.2. Mitosezahl der Nebennierenrinden

Bei den Nebennieren wurden nur markenthaltende 'Äquatorialschnitte' ausgewertet. Pro-, Meta- Ana-/Telophasen wurden in Zona fasciculata (ZF) und Zona glomerulosa (ZG) separat erfaßt. Pro Organ wurden zwei repräsentative Anschnitte komplett ausgezählt (s. Abb. 2).

3.5.3 Mitoseindices der Gll. submandibulares

Die Auszählung der Mitosen erfolgte an Längsschnitten der Organe. Dabei wurde pro Tier ein gesamter Querschnitt durch mäanderartiges Verschieben unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung, nach Kompartimenten getrennt, ausgezählt. Schalt-, Streifenstücke und große Ausführungsgänge wurden wegen eines vergleichsweise geringen Anteils an der Gesamtzellzahl der Drüsen nicht ausgewertet. Der Berechnung des MI der Azini liegen ungefähr 4200, bei den GCT ca. 1800 Zellkerne pro Tier zugrunde (s. Abb. 3).

3.5.4. Mitoseindex der Pars intermedia der Hypophyse

Pro Tier wurden alle Zellkerne in einem repräsentativen Anschnitt des Hypophysenmittellappens ausgezählt. Da sich die Zell-(Kern-)Zahl in benachbarten Stufenschnitten unwesentlich verändert, wurden die Mitosen in 2 weiteren Schnitten ausgezählt und die Gesamtzahl gedrittelt. Den berechneten Mitoseindices liegen pro Tier ca. 3000 Zellkerne zugrunde.

3.6. Biostatistische Auswertung des Datenmaterials

Bei allen Experimenten wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der Stichprobe errechnet. Die einzelnen Werte sind in Tabellen erfaßt und graphisch dargestellt.

Zur Bewertung der relativen Organgewichte, der Mitoseindices von Drüsenmägen, Hypophysen, Speicheldrüsen und der Mitosezahlen der Nebennierenrinde kam das Prüfverfahren nach Mann und Whitney (U-Test) zum Einsatz. Dies ist ein gängiger nichtparametrischer Test für Mittelwertvergleiche von unabhängigen Stichproben. Gerade für kleine Stichprobenumfänge, bei denen eine Normalverteilung nicht unbedingt vorausgesetzt werden kann, ist der Test besonders geeignet (Büning und Trenkler 1978; Lohse und Ludwig 1982). Dies ist bei uns der Fall, da wir bemüht waren nicht nur aus materiellen, sondern auch aus ethischen Gründen die Anzahl der Versuchstiere möglichst klein zu halten. Durch den teilweise geringen Stichprobenumfang ($n=3$) ist allerdings die statistische Aussage eingeschränkt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

Bei allen Versuchen mit Colchizin bzw. Vincristin wurde außerdem ein Blockadefaktor (BF) angegeben:

$$\text{BF} = \frac{\text{Mitosezahl blockierter Tiere (bei identischer Vorbehandlung)}}{\text{Mitosezahl unblockierter Tiere}}$$

Der BF diente als grober Richtwert zur Einschätzung der Wirksamkeit der Spindelgifte ohne statistischen Aussagewert.

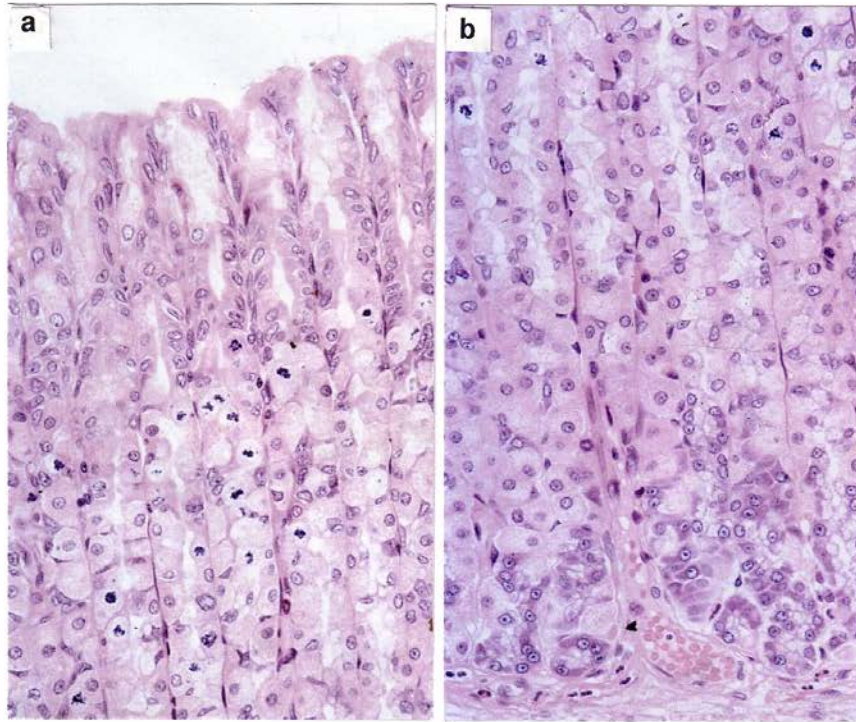


Abb. 1: Corpus ventriculi nach Vincristin-Blockade der Metaphasen.
HE-Färbung; x 400.

a: Mitosefreie Foveolae (oben), zahlreiche Mitosen in Drüsenhälsen und äußeren Kryptenzonen.

b: Weniger Mitosen in den Mittelstücken der Drüsen, nahezu keine Mitosen im Drüsenfundus.

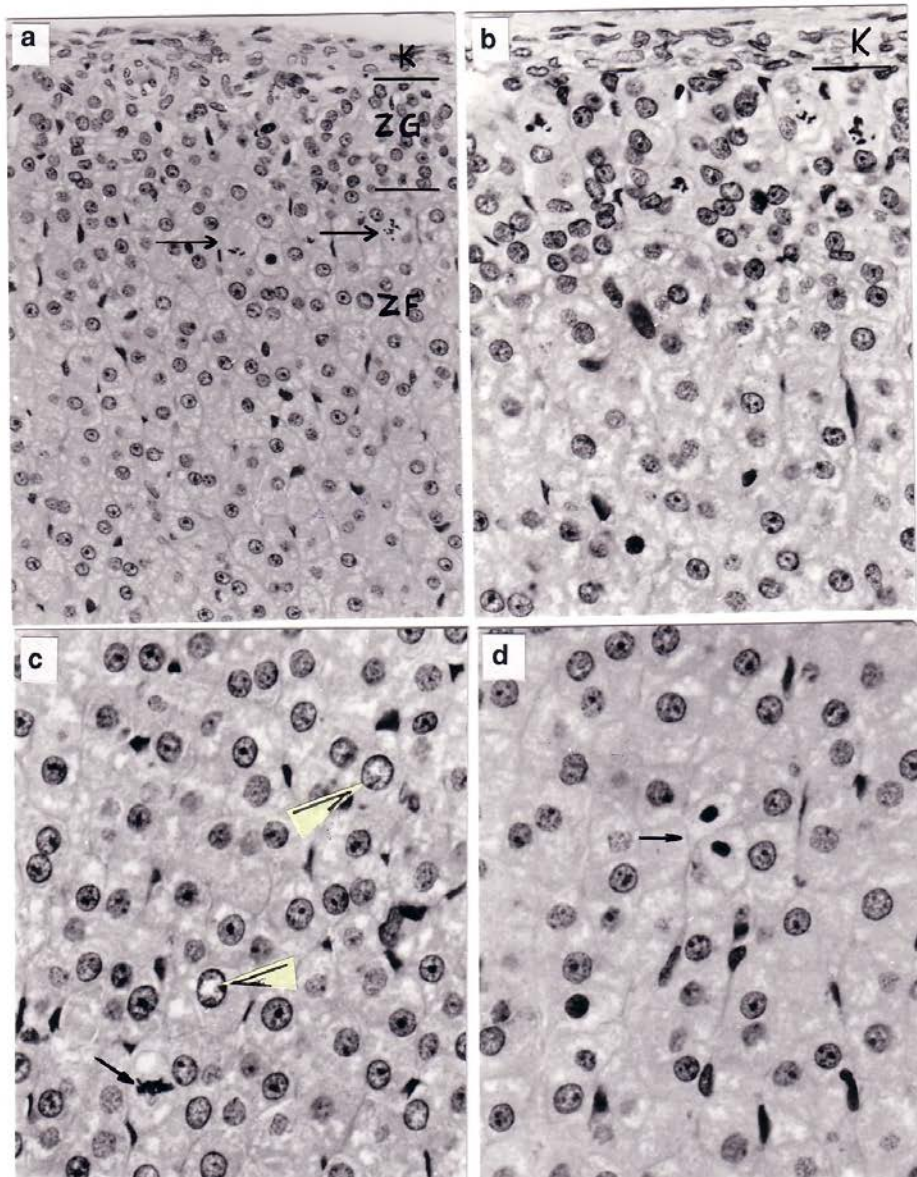


Abb. 2: Mitosen der Nebennierenrinde.

a: Organkapsel (K ; oben), Zona glomerulosa (ZG) , Zona fasciculata (ZF - unten); zwei Metaphasen (→) nach Colchizinblockade in der äußeren Schicht der ZF eines AAF-behandelten Tieres. HE-Färbung; x 400.

b: Organkapsel (K ; oben), ZG (oben) mit vier colchizinblockierten Metaphasen bei einem Reserpin-behandelten Tier. HE-Färbung; x 640.

c: Äußere ZF mit zwei Prophasen (Pfeilspitzen) und einer Metaphase (→). HE-Färbung; x 800.

d: Telophase (→) in der äußeren ZF; x 800.

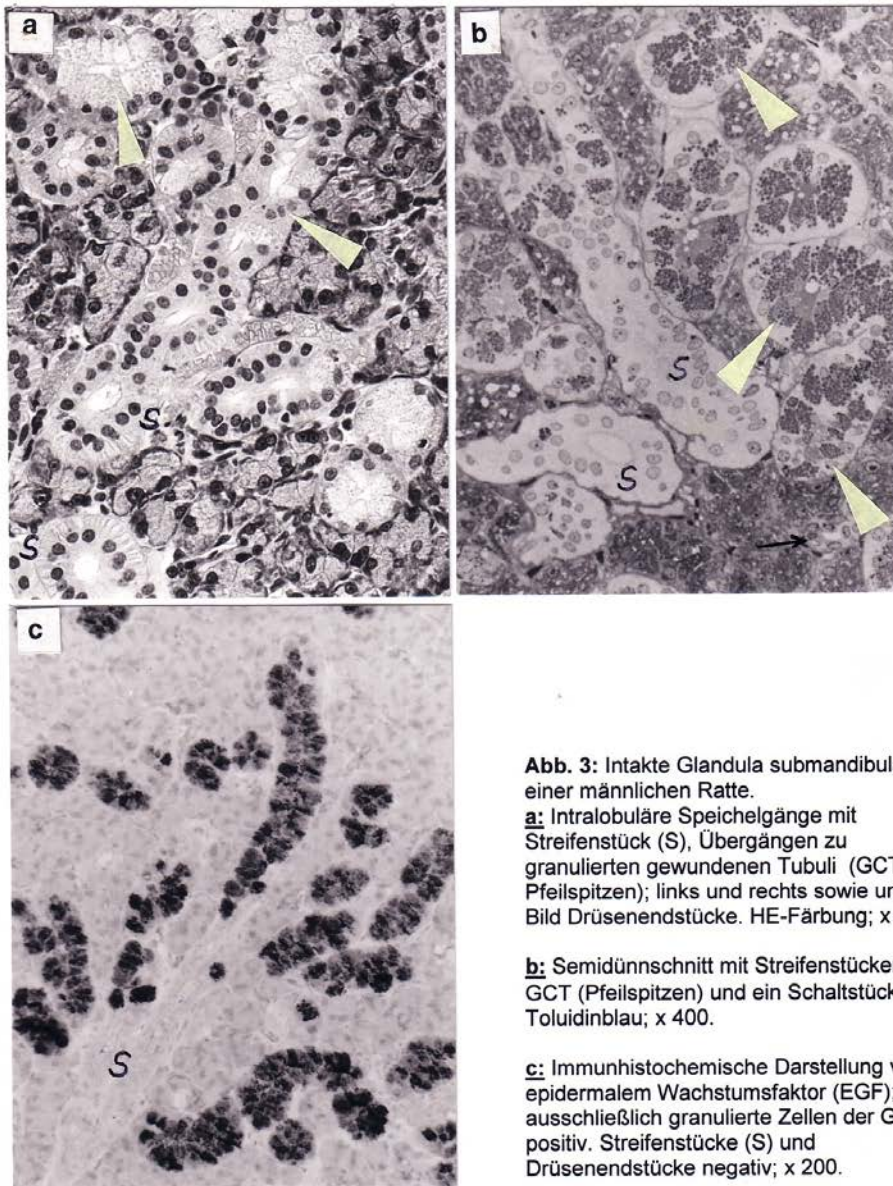


Abb. 3: Intakte Glandula submandibularis einer männlichen Ratte.

a: Intralobuläre Speichelgänge mit Streifenstück (S), Übergängen zu granulierten gewundenen Tubuli (GCT; Pfeilspitzen); links und rechts sowie unten im Bild Drüsenendstücke. HE-Färbung; x 400.

b: Semidünnschnitt mit Streifenstücken (S), GCT (Pfeilspitzen) und ein Schaltstück (→). Toluidinblau; x 400.

c: Immunhistochemische Darstellung von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF); ausschließlich granulierte Zellen der GCT positiv. Streifenstücke (S) und Drüsenendstücke negativ; x 200.

4. Ergebnisse

4.1. Kurzzeiteffekte von Fluorenon

Das Experiment wurde an 35 männlichen, ca. 12 Wochen alten und durchschnittlich 245 g schweren Ratten vom Stamm Uje - Wist durchgeführt. Die folgenden

Versuchsgruppen erhielten um 10.00 Uhr Fluorenon oder das Lösungsmittel DMSO per Magensonde.

A) Tötung nach 36 h (22.00 Uhr)

Gruppe	1a	n=3	Fluorenon 200 mg/kg KG + Vincristin 0,1 mg
	1b	n=4	Fluorenon 200 mg/kg KG + NaCl
	3 a	n=3	DMSO 2 ml/kg KG + Vincristin 0,1 mg
	3 b	n=3	DMSO 2ml/kg KG + NaCl
	5 a	n=3	Kontrolle + Vincristin 0,1 mg
	5 b	n=3	Kontrolle + NaCl

B) Tötung nach 48 h (10.00 Uhr)

Gruppe	2 a	n=3	Fluorenon 200 mg/kg KG + Vincristin 0,1 mg
	2 b	n=4	Fluorenon 200 mg/kg KG
	4 a	n=3	DMSO 2 ml/kg KG + Vincristin 0,1 mg
	4 b	n=2	DMSO 2 ml/kg KG + NaCl
	6 a	n=4	Kontrolle + Vincristin 0,1 mg
	6 b		keine Tiere verfügbar

Vincristin (Teilgruppen a) bzw. NaCl (Teilgruppen b) wurde 3 Stunden vor Tötung injiziert. Damit war beabsichtigt, die Wirkung von FON und Vincristin zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung bzw. in unterschiedlichen zirkadianen Phasen zu erfassen.

4.1.1. Körper- und Organgewichte

Im Verlauf der kurzen Versuchszeiträume (36 bzw. 48 h) traten in keiner Gruppe signifikante Veränderungen der relativen Körper-, NN- und Thymusgewichte auf.

Das relative Lebergewicht war nach 36 h (abends) gegenüber dem nach 48 h (morgens) in den FON-Gruppen, der DMSO- und Kontrollgruppe jeweils mit Vincristin signifikant erniedrigt. Außerdem war das rel. Lebergewicht in der FON-Gruppe mit Vincristin (48 h) gegenüber der zeitgleichen Kontrollgruppe (48 h + Vincristin) signifikant erhöht.

Die relativen Milzgewichte waren in den Kontroll- und DMSO- Gruppen nach 36 und 48 h in etwa auf gleichem Niveau. FON führte nach 36 h (abends) zu signifikant erniedrigten Werten im Vergleich zur Morgengruppe (48 h) (Abb. 4).

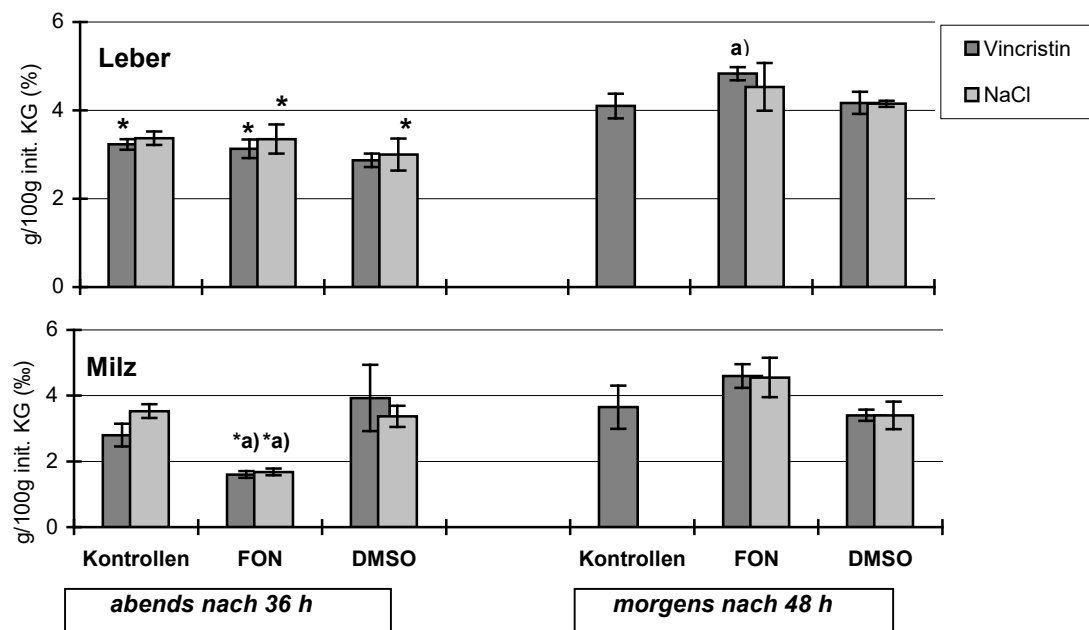


Abb. 4: Relative Leber- und Milzgewichte (a.m. \pm SD) bei unbehandelten Kontrolltieren sowie nach FON- bzw. DMSO-Behandlung.

^{*)} kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber analoger Morgengruppe (48 h),

^{a)} gegenüber den Kontrollen.

4.1.2. Mitosezahlen in der Nebennierenrinde (NNR)

Die NN waren histologisch ohne jegliche Gewebeschäden. Die Gesamtzahl der blockierten Mitosen war bei den intakten Kontrollen morgens signifikant höher als abends. Dies traf auch für die FON-behandelten Tiere zu, unabhängig davon, ob Vincristin verabreicht wurde oder nicht. Der blockierende Effekt (BF 1,6-1,8) des Vincristins schien morgens bei diurnal erhöhter Mitosezahl stärker zu sein (Abb. 5).

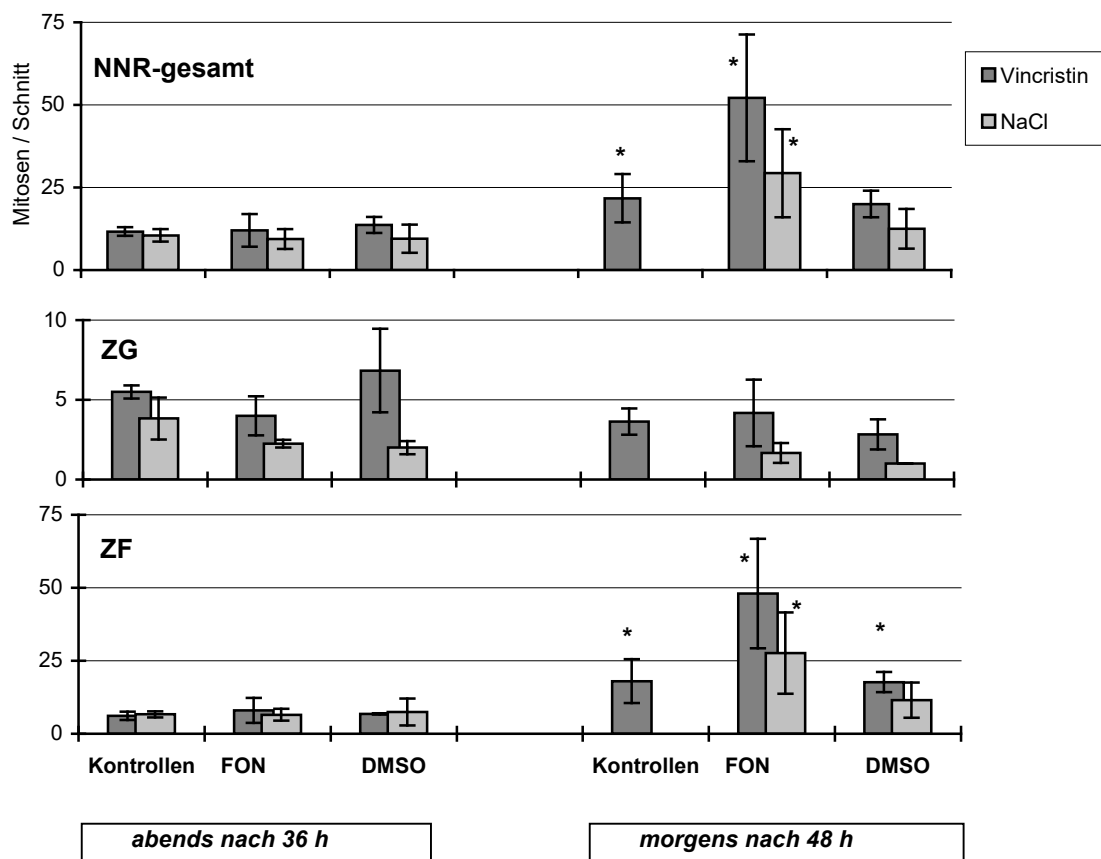


Abb. 5: Gesamtzahl der Mitosen der NNR sowie separate Werte der Zona glomerulosa (ZG) und Zona fasciculata (ZF) von Kontrollen sowie 36 h bzw. 48 h nach FON- bzw. DMSO-Behandlung (a.m. \pm SD).

*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber analoger Abendgruppe (36 h).

In der *Zona glomerulosa* (ZG) fanden sich vergleichsweise wenig Mitosen (s. Ordinaten in Abb. 5) und keine signifikanten Unterschiede in der Mitosezahl in Abhängigkeit von Behandlung und Tagesrhythmik. Tendenziell nahm die Zellteilung abends zu. Der Blockadefaktor (BF) lag bei zwischen 2 und 3 trotz unvollständigen Vincristinblocks, was sich aus dem Nachweis einzelner Ana-/Telophasen ergab (Abb. 6).

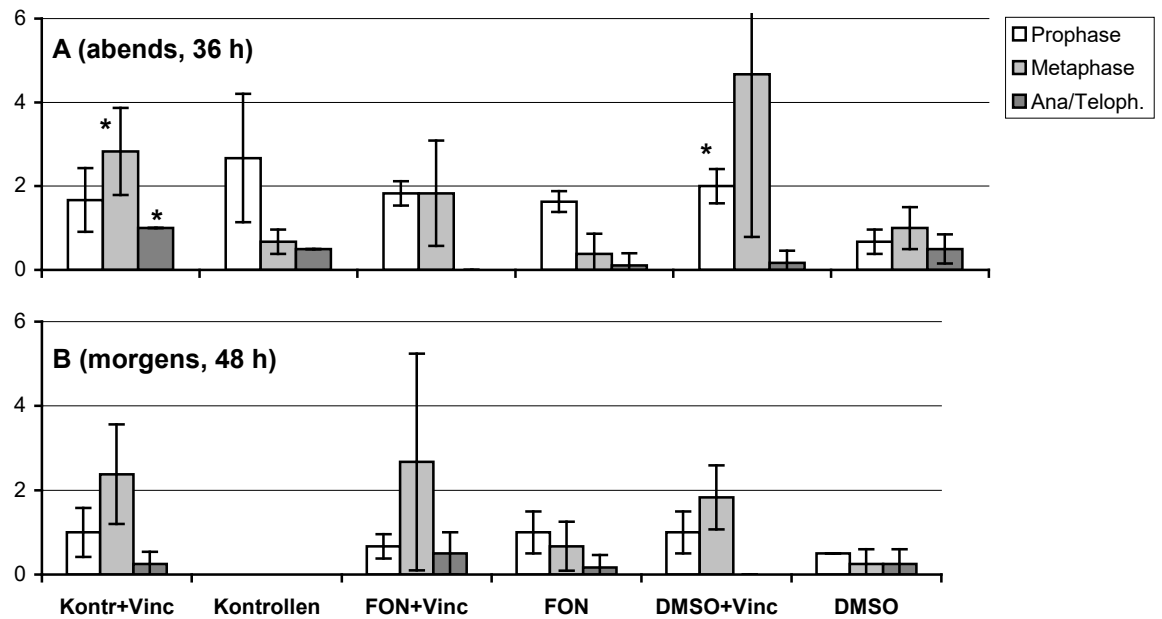


Abb. 6: Absolute Häufigkeit der Mitosephasen (a.m. \pm SD) in der Zona glomerulosa (**ZG**) bei Kontrollen sowie 36 h (A, abends) bzw. 48 h (B, morgens) nach FON- und DMSO-Behandlung.

^{*)} kennzeichnet signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zur gleichen Gruppe ohne Vincristin

In der Zona fasciculata (**ZF**) zeigten sich zirkadiane Unterschiede mit höheren Werten am Morgen. Nach FON war die tageszeitliche Differenz signifikant, nach DMSO und bei den Kontrollgruppen nur in Verbindung mit Vincristin (Abb. 5). Die Werte 48 h nach FON waren gegenüber der Kontrolle im Durchschnitt stark erhöht, jedoch aufgrund der relativ großen Streuung bei nur 3 Tieren nicht signifikant ($p = 0,077$).

Abends (nach 36 h) erschien der Vincristineffekt geringer ($BF = 1$), abzulesen am vergleichsweise geringen Metaphasenanteil bei nachweisbarem Abfall des Ana-Telophasenanteils. Vormittags (nach 48 h) zeigte sich ein Blockierungseffekt (BF 1,5 bis 2; Abb. 5), obwohl einige Ana-/Telophasen auftraten (inkompletter Block; Abb. 7).

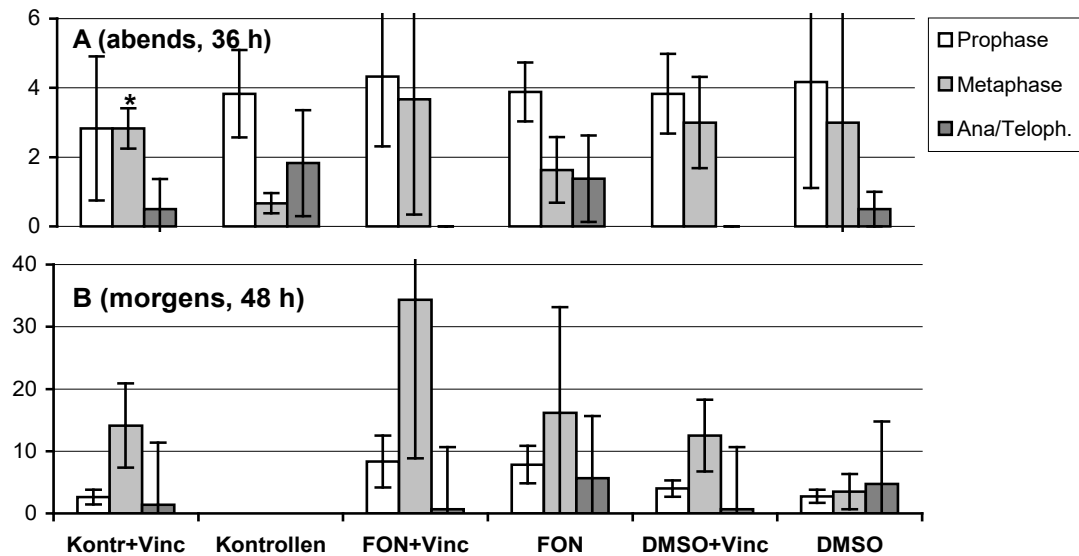


Abb. 7: Absolute Häufigkeit der Mitosephasen (a.m. \pm SD) in der Zona fasciculata (ZF) bei den Kontrollen sowie 36 h (A, abends) bzw. 48 h (B, morgens) nach FON- bzw. DMSO-Behandlung.

*) kennzeichnet signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zur gleichen Gruppe ohne Vincristin

4.1.3. Mitoseindex der Drüsenmägen

In den Drüsenmägen (Abb. 8) konnten keine Unterschiede der MI weder beim Vergleich der Tageszeiten noch der Behandlung gefunden werden. Vincristin wirkte mit einem BF von 1,9-5, wobei die Blockierung 48 h nach FON am stärksten war (Abb. 8). Histologisch fanden sich keine Schleimhautläsionen.

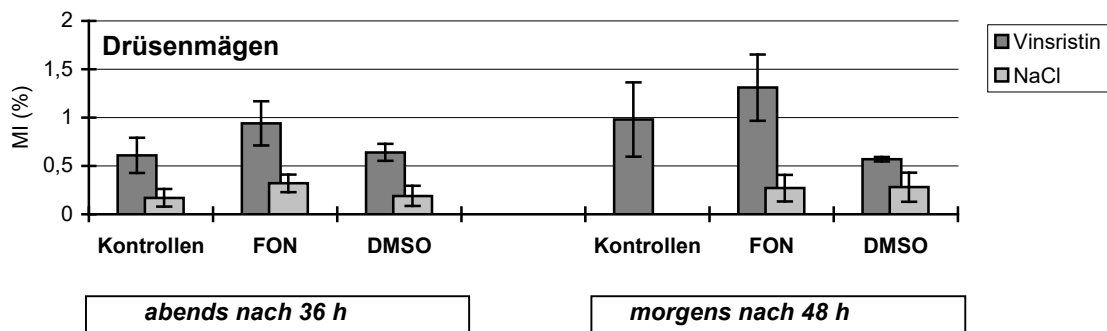


Abb. 8: MI (a.m. \pm SD) der Drüsenmägen bei Kontrollen sowie 36 bzw. 48 h nach FON- und DMSO-Behandlung

4.1.4. Zellteilung in den Gll. submandibulares

Lichtmikroskopisch fanden sich keine morphologischen Schäden. Der Mitoseindex war in den **Azini** der mit FON+Vincristin behandelten Tiere abends (nach 36 h) niedriger als in der entsprechenden Kontrolle (nicht signifikant, da nur Präparate von 2 Kontrolltieren verfügbar waren). Nach DMSO+Vincristin war der MI morgens signifikant höher als abends, also entgegengesetzt zum Verhalten der vincristinblockierten Kontrolle. Es fällt auf, daß 48 h nach FON kein Blockadeeffekt von Vincristin sichtbar wurde (Abb. 9).

In den **GCT** war der MI 48 h nach FON (morgens) signifikant höher als nach 36 h (abends). Dies zeigte sich auch bei den Kontrollen.

Die Vincristinblockade wirkte in beiden Kompartimenten (GCT und Azini) mit einem BF von ca. 1,2 – 5 (Abb. 9).

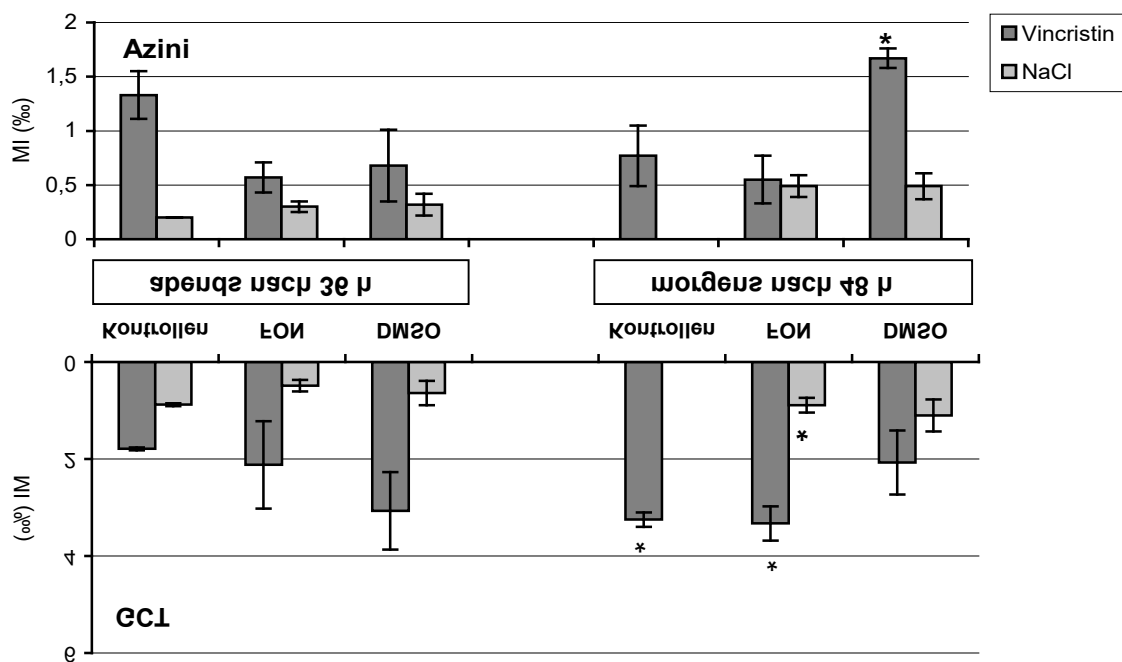


Abb. 9: MI (a.m. \pm SD) der **Azini** und der Granulated Convolved Tubules (**GCT**) bei Kontrolltieren sowie 36 bzw. 48 h nach FON- und DMSO-Behandlung.

*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur analogen Abendgruppe.

4.2. Kurzzeitwirkung (48 h) von 2-Acetylaminofluoren (AAF) und Reserpin

Das Experiment wurde an 42 männlichen Uje-Wist-Ratten durchgeführt. Zu Beginn des Versuchs betrug das mittlere Körpergewicht der Tiere ca. 210 g , das Alter ca. 9 Wochen. Folgende Gruppen wurden untersucht :

Gruppe	1	n=7	AAF 100 mg/kg KG
	2	n=7	AAF 100 mg/kg KG+Colchizin 3 mg/kg KG
	3	n=7	Kontrolle
	4	n=7	Kontrolle + Colchizin 3 mg/kg KG
	5	n=7	Reserpin 25 mg/kg KG
	6	n=7	Reserpin 25 mg/kg KG+Colchizin 3 mg/kg KG

AAF (gelöst in 1,65 ml DMSO/kg KG) wurde über Magensonde und Reserpin (gelöst in 1ml DMSO/kg KG) subkutan um 10.00 Uhr appliziert. Die Mitoseblockade mit Colchizin (gelöst in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung/kg KG) erfolgte jeweils 3 h vor Tötung durch subkutane Injektion.

4.2.1. Körper- und Organgewichte

Die relativen Körper- und Organgewichte zeigten einige behandlungsbedingte Abweichungen von den Kontrollwerten (Tab. 2). Das relative Thymusgewicht war nach Reserpin signifikant niedriger als bei den AAF- behandelten und Kontrolltieren mit und ohne Colchizingabe.

Tab. 2: Relative Körper- und Organgewichte (a.m. \pm SD) bezogen auf das initiale Körpergewicht bei Kontrollen, nach AAF- bzw. Reserpinbehandlung

Gruppe	rel. Körpergewicht in % a.m. (SD)	rel. Lebergewicht in % a.m. (SD)	rel. Thymusgewicht in ‰ a.m. (SD)	Rel. NNgewicht in ‰ a.m. (SD)
Kontrolle + Colchizin	-	4,44 (0,21) ^{a)}	1,55 (0,22)	0,17 (0,02)
Kontrolle	-	4,75 (0,18)	1,53 (0,42)	0,16 (0,01)
AAF + Colchizin	93,0 (2,3)	4,06 (0,19) ^{a)}	1,34 (0,10)	0,20 (0,02) ^{a) b)}
AAF	94,0 (3,7)	4,44 (0,48)	1,61 (0,40)	0,16 (0,01)
Reserpin + Colchizin	89,5 (2,9)	4,17 (0,41) ^{a)}	0,83 (0,15) ^{a) c)}	0,18 (0,02)
Reserpin	92,3 (4,3)	4,36 (0,29) ^{a)}	1,01 (0,12) ^{a)}	0,19 (0,02) ^{a)}

a) signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der analogen Kontrolle;

b) signifikant ($p < 0,05$) gegenüber AAF;

c) signifikant ($p < 0,05$) gegenüber Reserpin

4.2.2. Mitosen in der NNR

Histologisch fanden sich intakte Organe (vgl. Abb. 2 und 14). AAF wirkte auf die NNR signifikant mitogen (Abb. 10). In der **ZG** war die Mitosezahl nach AAF im Vergleich zur Kontrolle und Reserpin signifikant erniedrigt (mit Colchizin).

Reserpin führte zu einer signifikanten Zunahme der Mitosen im Vergleich mit AAF und Kontrollen (ohne Colchizin). Colchizin blockierte die Mitosen in allen Gruppen vollständig (keine Ana-/Telophasen), jedoch mit stark unterschiedlichem BF (AAF: 2 ; Reserpin: 2,3; Kontrollen 10).

Im Gegensatz zur ZG traten in der **ZF** folgende Veränderungen auf (Abb. 10):

- a) Signifikante mitogene Wirkung von AAF;
- b) Unwirksamkeit von Reserpin;
- c) Nach AAF ist die Metaphasenblockade unvollständig, da noch Ana- / Telophasen auftraten (Abb. 11);
- d) Trotz der kompletten Metaphasenblockade in der Kontrollgruppe und nach Reserpin nimmt die Gesamtzahl der ZF-Mitosen nicht zu.

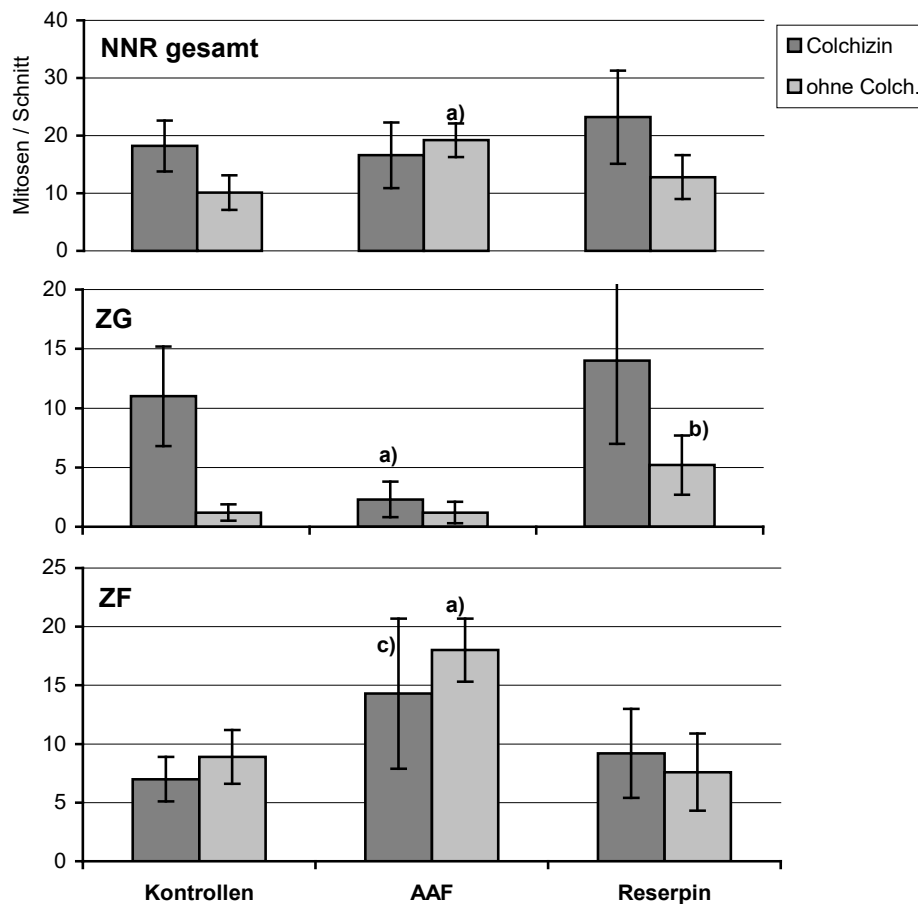


Abb. 10: Gesamtzahl der Mitosen der NNR sowie separate Werte (a.m. \pm SD) der Zona glomerulosa und fasciculata von Kontrollen sowie 48 h nach AAF- bzw. Reserpingabe.

- a) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber Kontrollen und Reserpin;
- b) gegenüber Kontrollen und AAF;
- c) gegenüber Kontrollen

Die Colchizinblockade in der **ZG** wirkte nahezu vollständig (signifikant erhöhte Metaphasen) und fehlende Ana-/Telophasen.

Bei den Kontrolltieren traten nach Colchizin signifikant mehr Prophasen auf als ohne das Spindelgift (Abb. 11).

In der **ZF** ließ sich ein Colchizineffekt nachweisen. Die Blockade war jedoch nach AAF unvollständig (vergleichsweise hoher Ana-/Telophasenanteil; Abb. 11). Trotz des eindeutigen Blockierungseffektes änderte sich die Zahl der Metaphasen gegenüber den unblockierten Tieren kaum. Nach Reserpin+Colchizin fanden sich signifikant weniger Prophasen (Abb. 11) als nach Reserpin allein.

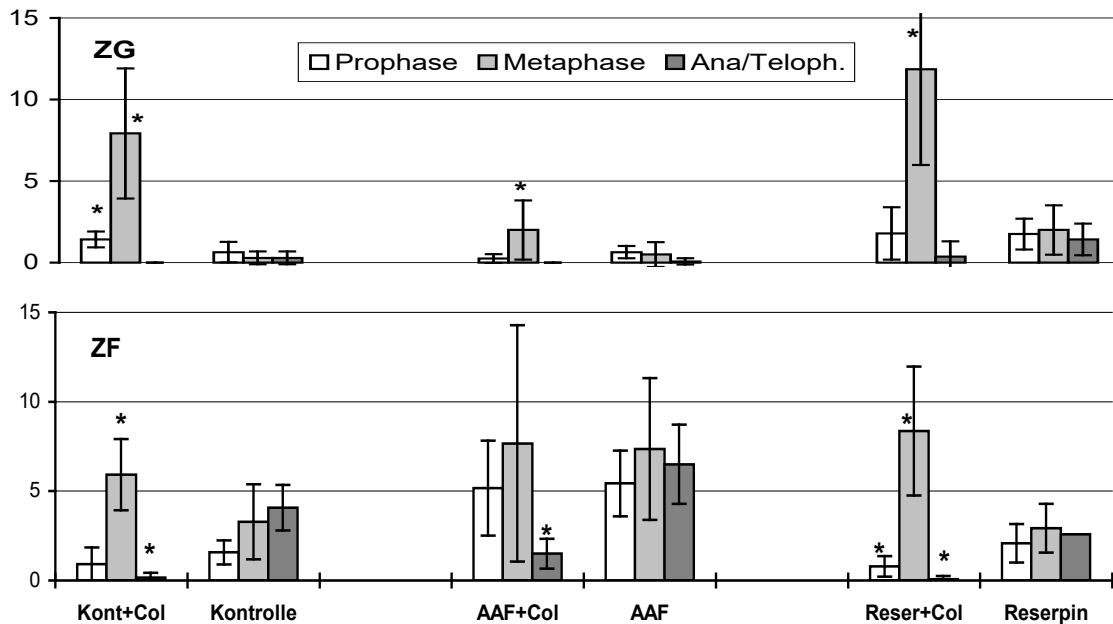


Abb.11: Absolute Häufigkeit der Mitosephasen (a.m. \pm SD) in der Zona glomerulosa (**ZG**) und fasciculata (**ZF**) bei Kontrolltieren sowie 48 h nach AAF- bzw. Reserpinbehandlung. *) kennzeichnet signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zur gleichen Gruppe ohne Colchizin

4.2.3. Mitosen in der Pars intermedia der Hypophyse

In der Pars intermedia der Hypophyse führte Reserpin zu einem signifikanten Anstieg der Mitosen gegenüber den Kontrollen und AAF. Der MI nach Colchizin war in allen Gruppen gegenüber den nichtblockierten signifikant erhöht.

Der BF betrug einheitlich etwa 2 (vgl. Abb. 12 und 13; Tab. 3).

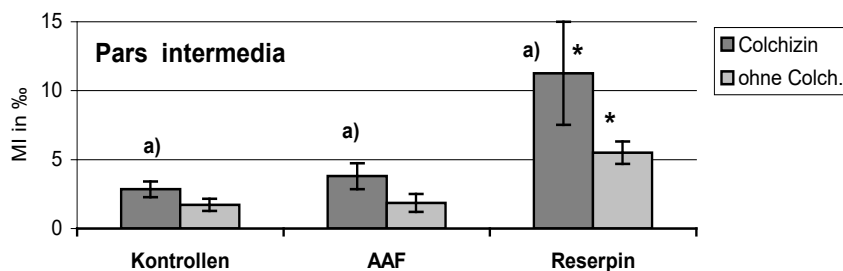


Abb. 12: MI (a.m. \pm SD) der Pars intermedia der Hypophyse. *) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber den Kontrollen; a) gegenüber den unblockierten Tieren

Tab. 3: Mitoseindex (MI in ‰ ; a.m. \pm SD) in der Pars intermedia der Hypophyse von Kontrollen bzw. 48 h nach AAF- oder Reserpin-Behandlung mit und ohne Colchizinblockierung

Behandlung	Mitoseindex	
	a.m.	(SD)
Kontrolle + Colchizin	2,85	(0,57)
Kontrolle	1,72	(0,44)
AAF + Colchizin	3,80	(0,94)
AAF	1,85	(0,65)
Reserpin + Colchizin	11,26 *)	(3,74)
Reserpin	5,50 *)	(0,81)

*) $p < 0,05$ gegenüber entsprechenden Kontrollen

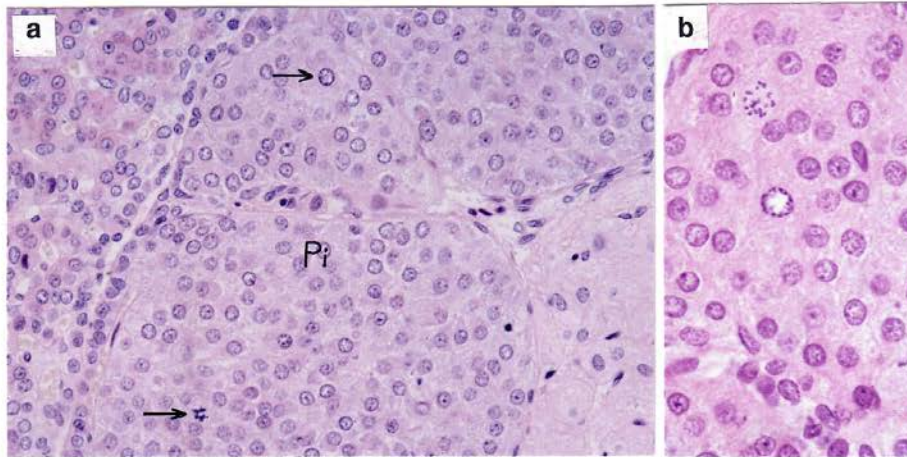


Abb. 13: Hypophyse eines Reserpin-behandelten Tieres.

a: Frontalschnitt mit Adenohypophyse (links), spaltförmigem Recessus hypophyseos, Pars intermedia (Pi) und Neurohypophyse (rechts). Eine Prophase und eine Metaphase (→) in der Pars intermedia. HE-Färbung; x 400.

b: Eine Metaphase mit versprengten Chromosomen nach Colchizinblockade und eine Prophase in der Pars intermedia; x 640.

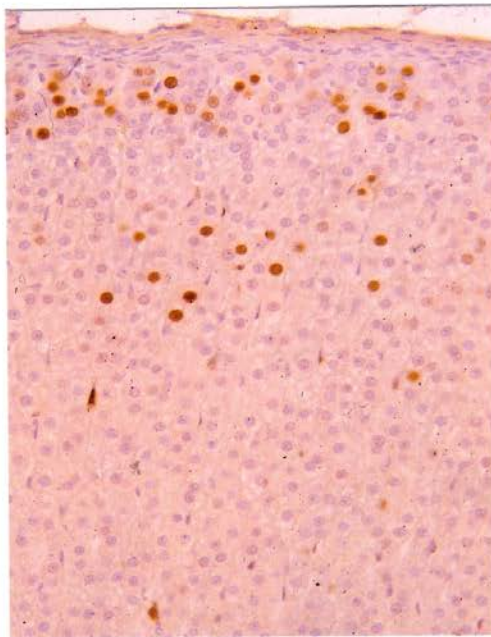


Abb. 14: Nebennierenrinde ; Immunhistochemische Darstellung von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 48 h nach Reserpin-Behandlung. Vergleichsweise starke Zunahme der Zellmarkierung in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (oben im Bild); x 320.

4.3. Kurzzeitwirkung (48 h) von Fluoren (FEN) und 2-Acetylaminofluoren (AAF)

In diesem Versuch wurden 38 männliche, 8 - 9 Wochen alte Uje-Wist-Ratten mit einem durchschnittlichen KG von 210 g verwendet. Die Tiere wurden in 6 Gruppen aufgeteilt und folgendermaßen behandelt :

Gruppe	1	n=5	NaCl 2,5 ml + NaCl 2,5 ml (Kontrolle)
	2	n=5	NaCl 2,5 ml + Colchizin 3mg/kg KG (Kontrolle)
	3	n=7	Fluoren 150 mg/kg KG + NaCl
	4	n=7	Fluoren 150 mg/kg KG + Colchizin 3 mg/kg KG
	5	n=7	AAF 150 mg/kg KG + NaCl
	6	n=7	AAF 150 mg/kg KG + Colchizin 3 mg/kg KG

AAF und Fluoren wurden gelöst in 2,5 ml/kg KG DMSO über Magensonde verabreicht. Die zusätzliche subkutane Injektion von NaCl bzw. Colchizin (in 2,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung gelöst) erfolgte 3 Stunden vor Tötung der Tiere (um 07.00 Uhr), d.h. 45 h nach Erstbehandlung vormittags um 10.00 Uhr.

4.3.1. Körper- und Organgewichte

Die mit AAF behandelten Tiere nahmen ca. 8 % an Körpergewicht ab (Tab. 4). Bei den relativen Milzgewichten fanden sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die behandlungsbedingten Veränderungen der relativen Thymusgewichte sind in Tab. 4 gekennzeichnet. Das relative Lebergewicht lag nach FEN signifikant über dem der Kontrollen und mit AAF behandelten Tiere. Auch nach Kombination von AAF mit Colchizin nahm das relative Lebergewicht zu.

AAF in Kombination mit Colchizin und auch FEN führten zur Erhöhung der relativen NN-Gewichte (Tab. 4 ; Abb. 15).

Die allein durch Colchizin bedingten Einflüsse auf die relativen Organgewichte sind ebenfalls in Tab. 4 angegeben.

Tab. 4: Relative Körper- und Organgewichte (a.m. \pm SD) bezogen auf das initiale Körpergewicht bei Kontrollen, nach AAF- bzw. FEN-Behandlung

Gruppe	rel. Körper- Gewicht in % a.m. (SD)	Rel. Leber- Gewicht in % a.m. (SD)	Rel. Milz- Gewicht in ‰ a.m. (SD)	rel. Thymus- gewicht in ‰ a.m. (SD)	rel. NN- gewicht in ‰ a.m. (SD)
Kontrolle+Colchizin	-	4,07 (0,15)	3,65 (0,24) ^{c)}	1,47 (0,14)	0,14 (0,01)
Kontrolle	-	4,12 (0,21)	4,53 (0,31)	1,60 (0,20)	0,15 (0,01)
AAF+Colchizin	92,15 (4,15)	4,58 (0,24) ^{b) c)}	3,66 (0,65)	1,47 (0,17)	0,19 (0,01) ^{b)}
AAF	91,94 (2,26)	3,92 (0,21)	3,88 (0,63)	1,32 (0,24)	0,16 (0,04)
FEN+Colchizin	100,79 (3,44)	5,55 (0,52) ^{a) b) c)}	4,20 (0,51)	1,74 (0,26) ^{b) c)}	0,20 (0,03) ^{b)}
FEN	99,40 (1,57)	4,88 (0,32) ^{a) b)}	4,55 (0,62)	1,37 (0,18)	0,17 (0,02) ^{b)}

a) signifikant ($p < 0,05$) gegenüber AAF;

b) signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der analogen Kontrolle;

c) signifikant ($p < 0,05$) gegenüber gleicher Behandlungsgruppe ohne Colchizin

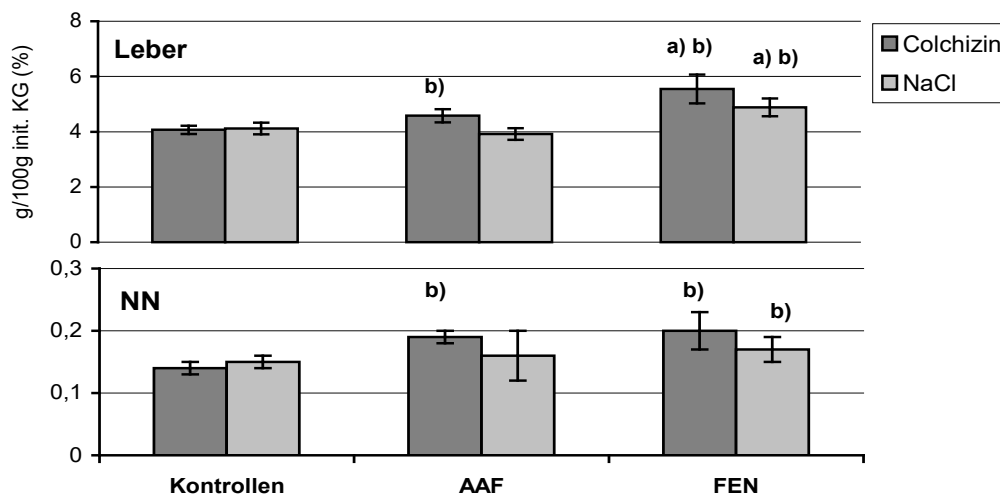


Abb. 15: Relatives Leber- und NN-Gewicht bei Kontrolltieren, sowie 48 h nach AAF- und FEN-Behandlung (a.m. \pm SD).

a) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der analogen AAF-Gruppe,

b) gegenüber analogen Kontrollen

4.3.2. NNR - Mitosen

Lichtmikroskopisch fanden sich keine morphologischen Veränderungen durch die Testsubstanzen. Die Gesamtzahl der NNR-Mitosen war nach FEN und AAF (ohne Colchizin) gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 16).

In der **ZG** blieb die Mitosezahl sowohl nach FEN als auch nach AAF auf Kontroll-ebene, unabhängig davon, ob eine Metaphasenblockade mit Colchizin stattfand oder nicht. Colchizin blockierte die Metaphasen in der ZG aller Gruppen vollständig (BF: 1-2; Abb. 17). Nach Analyse der einzelnen Mitosephasen zeigte sich

ohne Colchizin ein Ana-/Telophasenanteil von ca. 12-15 %. Das Fehlen dieser Phasen nach Colchizin spricht für einen vollständigen Metaphaseblock (Abb. 17).

In der **ZF** war die Zellteilung bei den mit FEN und AAF behandelten Tieren signifikant erhöht; beide Gruppen unterschieden sich jedoch nicht (Abb. 16). Die Analyse der Mitosephasen ergab in allen Colchizin-behandelten Gruppen nicht nur eine Metaphasenblockade, sondern auch eine Abnahme der Mitosezahl, die jedoch nur bei den FEN-Tieren signifikant war. Dies korreliert mit den Befunden nach AAF im vorab dargestellten Versuch (4.2.2; Abb. 10) und drückt sich auch in dem niedrigen BF aus: bei den Kontrollen ca. 0,8 ; nach FEN 0,4 und nach AAF 0,75.

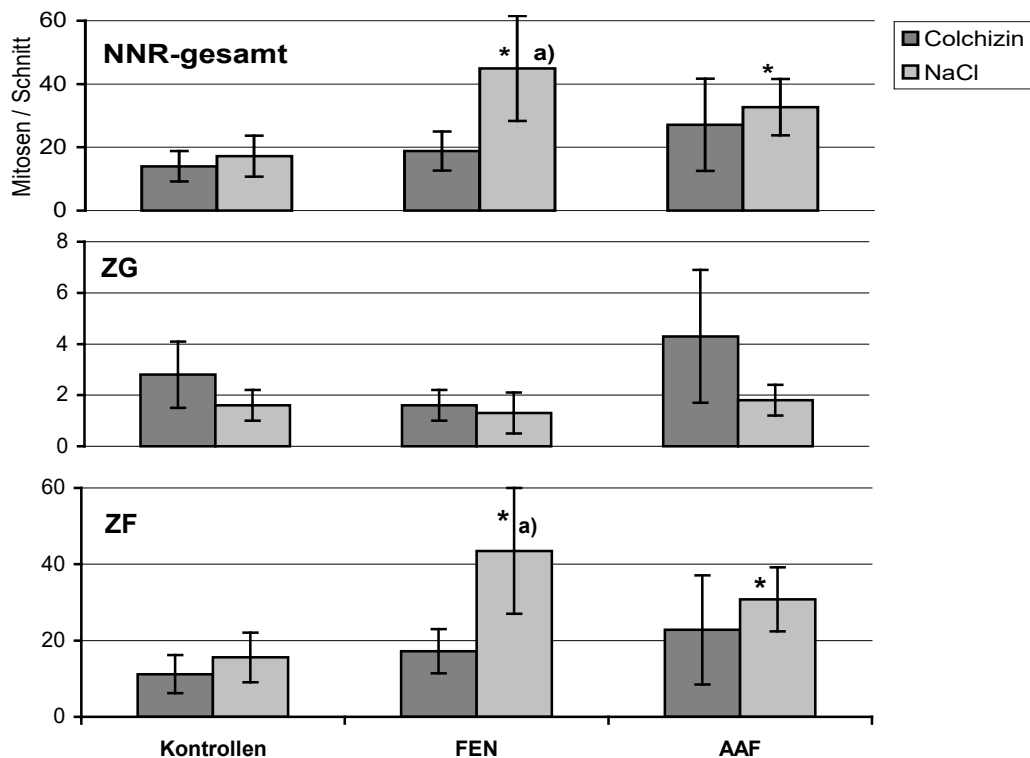


Abb. 16: Gesamtzahl der Mitosen der NNR, sowie separate Werte der **ZG** und **ZF** von Kontrollen sowie 48 h nach FEN- bzw. AAF-Behandlung (a.m. \pm SD).

*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber analoger Kontrollgruppe (48 h);

a) gegenüber analoger Gruppe mit Colchizin

Nach Colchizingabe fanden sich nur sehr wenige Ana-/Telophasen als Ausdruck des nahezu vollständigen Metaphasenblocks. Daß die Gesamtzahl der Prophasen nach FEN+Colchizin signifikant geringer war als nach FEN allein (Abb. 17) belegt recht eindeutig, daß durch die Colchizingabe weniger Zellen in den Mitosezyklus eintreten.

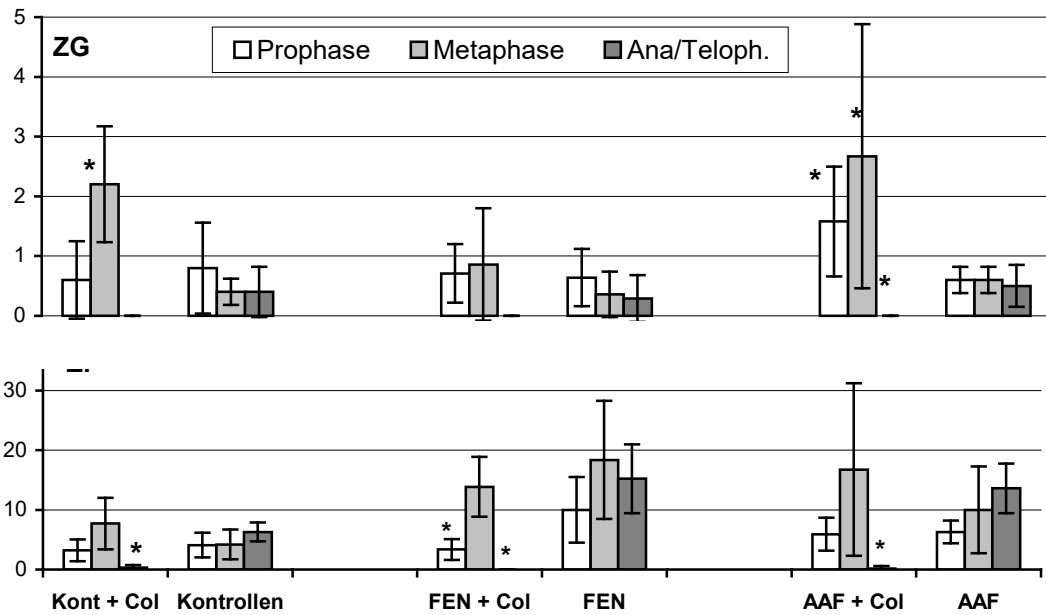






Abb. 17: Absolute Häufigkeit der Mitosephasen (a.m. \pm SD) in Zona glomerulosa (**ZG**) und fasciculata (**ZF**) bei Kontrollen sowie 48 h nach FEN- bzw. AAF-Behandlung .

*) kennzeichnet signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zur gleichen Gruppe ohne Colchizin

4.4. Mitosen im Drüsenmagen nach Sialadenektomie, Scheinoperation sowie 2- Acetylaminofluoren (AAF) kombiniert mit Beta-Naphtoflavon (BNF)

30 männliche Ratten vom Stamm Han-Wist (durchschnittliches initiales Körpergewicht von 245 g) wurden in 6 Gruppen eingeteilt und während der 10-tägigen Versuchsdauer wie folgt behandelt :

Versuchsgruppen und zeitlicher Ablauf nach Beginn des Experiments am Tag 0 :

		0. d	Versuchsdauer	7. p.o.d	8.p.o.d	10. p.o.d
						
1.	n=5	2-AAF (Tötung nach 48 h)				
2.	n=5	SOP (Scheinoperation)				Tötung
3.	n=5	OP (Operation)				Tötung
4.	n=5	OP		DMSO	AAF	Tötung
5.	n=5	OP		BNF	AAF	Tötung
6.	n=5	OP		BNF	DMSO	Tötung

Dosierungen : AAF 150 mg/kg KG;
Beta-Naphtoflavon (BNF) 50 mg/kg KG ;
DMSO 2 ml

AAF und BNF wurden in 2 ml DMSO gelöst und über Magensonde appliziert. Die Operation (OP) bestand in der Entfernung der Gll. submandibulares und sublinguales. Bei der Scheinoperation (SOP) erfolgte lediglich eine operative Freilegung der Drüsen wie bei Sialadenektomie. Operative Eingriffe, Behandlungen bzw. Tötung erfolgten vormittags zwischen 9-12 Uhr.

4.4.1. Körper- und Organgewichte

Das KG der nur mit AAF behandelten Tiere entsprach bei Tötung nach 48 h etwa dem initialen KG. Alle operierten und scheinoperierten Tiere wurden entsprechend dem zuvor skizzierten Versuchsablauf erst nach 10 Tagen getötet und jeweils bei den Behandlungen am 7. und 8. postoperativen Tag gewogen. Erwartungsgemäß

fand sich der größte KG-Zuwachs bei den scheinoperierten, die als Kontrolle zum Vergleich mit den sialadenektomierten Tieren dienten. Letztere zeigten durchgehend nur einen minimalen, signifikant geringeren Zuwachs an Körpermasse, die auch durch die Substanzgaben am 7. und 8. postoperativen Tag kaum beeinflusst wurde. Der fehlende KG-Zuwachs war offensichtlich auch verantwortlich für die unwesentlich geringeren relativen Milzgewichte. Die relativen Thymusgewichte lagen alle auf dem Niveau der scheinoperierten Tiere. Die Unterschiede zu den nur AAF behandelten Tieren sind am ehesten dem um 8 Tage höheren Lebensalter zuzuschreiben und als Involutionsprozeß aufzufassen. Dafür spricht m.E. auch, daß sich bei vergleichbaren initialen KG (240 ± 15 g) die a.m. der absoluten Thymusgewichte der Gruppen zwischen 355 mg (scheinoperierte Tiere) und 269 mg (OP+DMSO+AAF) bewegen.

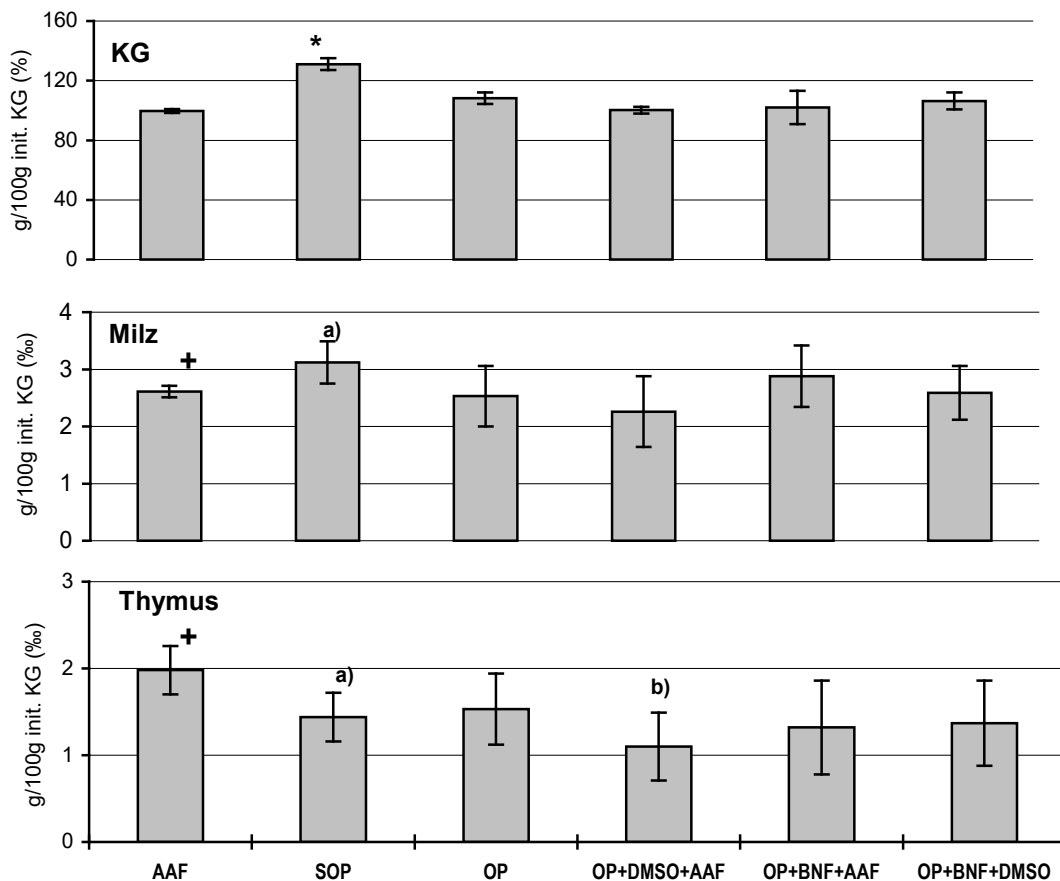


Abb. 18: Relative Körper-, Milz- und Thymusgewichte der einzelnen Versuchsgruppen (a.m. \pm SD).

*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber allen anderen Gruppen,

+) gegenüber der mit a) und b) markierten Gruppen

4.4.2. Mitoseindex der Drüsenmägen

Im Vergleich der MI der Drüsenmägen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen (Abb. 19). Auch morphologisch waren die Organe vollkommen intakt.

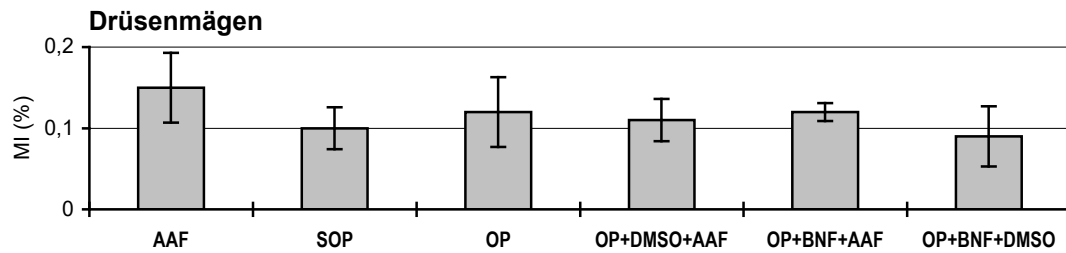


Abb. 19: MI des Drüsenmagens der einzelnen Versuchsgruppen (a.m. ± SD).

5. Diskussion

5.1 Anmerkungen zur Versuchsdurchführung

Um die Versuche miteinander vergleichen zu können, wurden die Versuchsbedingungen (Raumtemperatur, Nahrung, Trinkwasser, Hell-/Dunkelrhythmus) weitgehend konstant gehalten. Zirkadiane Einflüsse wurden soweit möglich minimiert, indem alle Manipulationen der Tiere (Behandlung, Tötung) zur gleichen Tageszeit erfolgten. Außerdem wurden die Versuchstiere gleich häufig exogenem Stress (z.B. Scheinbehandlung bzw. Scheinoperation bei Kontrollen) ausgesetzt, um hier ebenfalls Gleichheit zu erzielen.

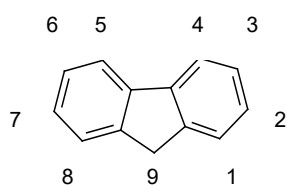
Aus langzeitigen Kanzerogenesestudien sind Spezies-, Stammes-, Geschlechts- und Altersunterschiede bekannt (Farmer et al. 1980; Asamoto et al. 1989; DeCloitre et al. 1990). Um einheitliche experimentelle Bedingungen zu schaffen, wurden auch unsere Kurzzeit-Versuche ausschließlich an jungen erwachsenen männlichen Ratten durchgeführt. Im Alter von 8-12 Wochen befinden sich die Tiere bereits im steady state, d.h. im Stadium stabiler (konstanter) physiologischer Zellerneuerung.

Das als Lösungsmittel verwendete Dimethylsulfoxid (DMSO) hat eine sehr geringe Toxizität, beeinflusste aber in zahlreichen analogen Versuchen die Proliferation der untersuchten Gewebe nicht (Amlacher et al. 1974; Danz et al. 1978b). Für DMSO sprach auch, daß sich schwer wasserlösliche Substanzen, wie z.B. einige Fluorenderivate gut lösen. Die in der Literatur empfohlene, intragastral zu applizierende Höchstdosis von 3-5 ml/kg KG (Robens et al. 1989) wurde in all unseren Versuchen deutlich unterschritten.

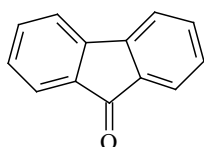
Der intragastrale Weg dürfte der Kanzerogenaufnahme unter natürlichen Bedingungen auch im Hinblick auf Distribution und Metabolisierung im Organismus am ähnlichsten sein.

5.2. Fluorenderivate und deren Metabolisierung

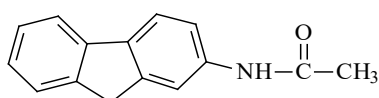
AAF zählt chemisch zu den aromatischen Aminen, einer Stoffgruppe mit weiter Verbreitung und starkem kanzerogenen Potential. Sie werden u.a. bei Verbrennungsvorgängen in Benzin- und Dieselmotoren, beim Grillen mit Holzkohle und beim Tabakrauchen gebildet, sind also ubiquitär in unserer Umwelt nachweisbar (Hoffmann und Rathkamp 1972; Schützle et al. 1982; Beije und Möller 1988). In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, kanzerogene Wirkungen in Abhängigkeit von der Position verschiedener Substituenten im Ausgangsmolekül zu untersuchen. AAF und Fluorenon sind Derivate des Fluorens, einer Substanz, der ein 3-Ring-Kohlenstoff-Atom-Gerüst zugrundeliegt (Abb. 20).



Fluoren (FEN)



Fluorenon (FON)



2-Acetylaminofluoren (AAF)

Abb. 20: Strukturformeln der Fluorene FEN, FON, AAF

Fluorenon (FON) und Fluoren (FEN) zeigten im PAT an der NNR (Danz et al. 1978a, Danz et Urban 1980) positive Testergebnisse wie bekannte Tumorpromotoren der Hepatokanzerogenese (z.B. Phenobarbital und polychlorierte Biphenyle; Sivak 1982; Save 1989). Im Kurzzeittest wirkten sie dosisabhängig mitogen auf Hepatozyten und erhöhten das relative Lebergewicht (Tab. 5). Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine promotorische Aktivität von FEN und FON; Genotoxizität konnte nicht nachgewiesen werden (Klopman et. al.

1990). Die Einführung einer Amino- bzw. Acetylaminogruppe an Position 2 (2-AAF; 2,4,7-AAF) führte in Mutagenitätstests zu Veränderungen an der DNS (Brouns et al. 1981), während die gleichen Substituenten in Position 4 (4-AAF) nicht mehr genotoxische, sondern promotorische (mitogene) Wirkungen auf Hepatozyten hatten (Gerlyng und Seglen 1990). Eine Benzoylgruppe in Position 2 ging mit dem Verlust der kanzerogenen Wirkung im Langzeit- sowie der promotorischen Aktivität im Kurzzeit-Versuch einher (Danz et al. 1988; 1992). AAF wird intrahepatisch Cytochrom-P450-abhängig hydroxyliert. Dabei werden N-hydroxylierende Isoenzyme induziert (Sato et al. 1981). Diese sollen bedeutsam für die kanzerogene Wirkung sein. Einige am Stickstoffatom hydroxylierte Metabolite werden über weitere Schritte letztlich zu freien Radikalen oxydiert, die mit Proteinen oder Nukleotidbasen in Wechselwirkung treten. Die AAF-Metaboliten besitzen laut Bartsch (1981) hohe Affinität zum Guanin (Abb. 21).

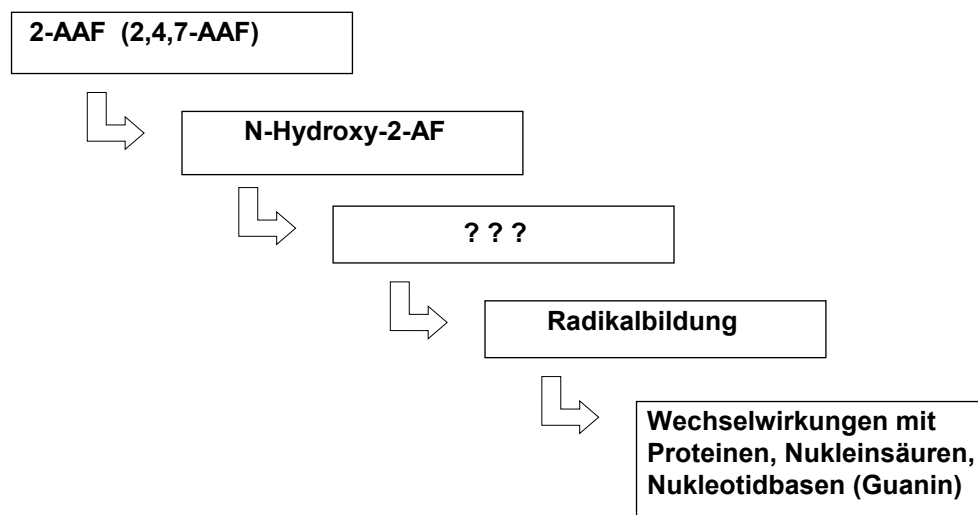


Abb. 21: mögliche Metabolisierungsstufen des AAF (nach Bartsch 1981)

Über die direkten Konsequenzen dieser Bindung an die DNS ist relativ wenig bekannt. Bei Langzeitversuchen mit AAF im mittleren Dosisbereich (100-200 mg/kg KG) an Ratten entstanden nach ca. 5-6 Wochen immunhistochemisch nachweisbare, lokale präneoplastische Veränderungen mit vermehrten Apoptosen im gesamten Leberläppchen (besonders im Periportalfeld). Hepatozelluläre Karzinome gehen erst bei weiterer Kanzerogenexposition aus diesen Präneoplasien hervor, die bis zu einer gewissen Entwicklungsstufe reversibel sind.

Hadjilov et al. (1995) deuten sie als Folge subzellulärer Schäden durch erhöhten oxidativen Stress mit verschlechterter mitochondrialer Energiegewinnung.

Neben der vergleichsweise gut erforschten hepatischen AAF-Metabolisierung sind auch AAF-metabolisierende Enzyme und AAF-Metaboliten in extrahepatischen Geweben bekannt und ein Hinweis darauf, daß auch systemisch eine Auseinandersetzung mit dem Kanzerogen erfolgt.

5.3. Systemische Wirkungen von Fluorenderivaten im Kurzzeittest

AAF bewirkt schon nach einmaliger Dosis von nur 5 mg/kg KG eine Abnahme des MI der Hepatozyten, was im allgemeinen als früher unspezifischer toxischer Effekt vieler genotoxischer Kanzerogene gewertet wird (Farber 1976). Bei Dosen bis 35 mg/kg KG zeigte sich eine leichte Zunahme des Lebergewichts (Danz et al. 1998), die am ehesten durch Induktion mikrosomaler Enzyme bedingt ist (Ayrton et al. 1990; Grasso et al. 1991; Kempe 1995). Bei höheren Dosen (75-150 mg/kg KG) fanden sich patho-morphologisch selektive Nekrosen in den Streifenstücken der Gll. parotides und den GCT der GSM mit reaktiver Sialadenitis (vgl. Abb. 23). Vermutlich führen diese Läsionen zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme mit Abnahme des KG (4.2.1., Tab. 2 ; Danz et al. 1997). Außerdem wirkt AAF stark mitogen auf Gallengangsepithel (Danz et al. 1991). Thymolytische Effekte, wie sie bei AAF-Dosen über 200 mg/kg KG auftreten, fanden wir bei der niedrigeren Dosierung (100-150 mg/ kg KG) nicht.

In einem breiten mittleren Dosisbereich (25-200 mg kg/KG) wirkte AAF als primäres Mitogen auf die ZF der NNR. Die strukturanaloge FEN und FON hatten dieselbe Wirkung. Unerwartet war, daß die mitogene Wirkung der Fluorene auf die ZF durch die präfinale Colchizingabe abschwächt bzw. unterdrückt wurde (4.1.2., Abb. 5; 4.2.2., Abb. 10; 4.3.2., Abb. 16).

Im Unterschied zu AAF zeigte sich nach FEN- und FON- Behandlung jedoch :

- ein Anstieg des MI der Hepatozyten ohne Nachweis zytotoxischer Substanzwirkungen (Nekrosen, entzündliche Veränderungen),
- kein Einfluß auf das Proliferationsverhalten des Gallengangsepithels,
- ein Absinken der relativen Milzgewichte, möglicherweise durch erhöhte Leberperfusion mit Mobilisierung lienaler Blutreserven.

Die relativen NN-Gewichte wurden durch keines der Fluorenderivate beeinflusst.

ZG der NNR, Drüsenmägen-, Esophagus- und Jejunumepithel verhielten sich gegenüber proliferogenen Wirkungen der Fluorenderivate refraktär (Blaszyk und Hartmann 1991; 4.1.3., Abb. 8; 4.4.2., Abb. 19).

Tab. 5: Darstellung der systemischen Wirkungen 48 Stunden nach einmaliger Gabe von Fluoren (FEN), Fluorenon (FON), 2-Acetylaminofluoren (AAF) und Reserpin

	AAF	FEN	FON	Reserpin
<u>Relative Gewichte</u>				
Körpergewicht	↓	↔	↔	↔
Leber	↑ - ↔ c)	↑	↑	↔
Milz	↔	↔	↔ - ↓ c)	↔
Thymus	↔ - ↓ c)	↔	↔	↓
Nebennieren	↔	↔	↔	↔
<u>Proliferation</u>				
Hepatozyten a)	↓	↑	↑	?
Gallengangsepithel b)	↑	↔	↔	?
Esophagus-Mucosa b)	↔	↔	↔	?
Drüsenmagen-Mucosa	↔	↔	↔	?
Jejunum-Mucosa b)	↔	↔	↔	?
NNR - ZG	↔	↔	↓	↑
- ZF	↑	↑	↑	↔
Gll. submandibulares - Azini	?	?	↔	?
- GCT	d)	?	↔	?
P. intermedia (Hypophyse)	↔	?	?	↑
<u>Zytotoxische Wirkungen</u>				
Gll. submandibulares - Azini	nein	nein	nein	?
- GCT	ja	nein	nein	?

↑ signifikante Steigerung; ↓ signifikante Abnahme; ↔ ohne Wirkung

a) zitiert nach Kempe 1995

b) zitiert nach Blaszyk und Hartmann 1991

c) dosisabhängig

d) restitutive Proliferation nach zytotoxischer Schädigung

5.4. Mögliche regulative Einflüsse der GII. submandibulares auf Wachstums- bzw. Differenzierungsprozesse

Daß Speicheldrüsen neben der Speichelproduktion auch endokrin sezernieren und am Metabolismus von Fremdsubstanzen beteiligt sind, ist seit längerem bekannt. Die immunhistochemische Darstellung von Cytochrom-P 450 2B1 zeigt beispielhaft, daß die verschiedenen Gewebskompartimente differenziert angefärbt sind (vgl. Abb. 23).

Besonderes Interesse kommt den GCT zu, da sie als Quelle endokriner Faktoren angesehen werden und hormonellen Regelmechanismen unterliegen (Srinivasan und Chang 1975; Barka 1980; Amano et al. 1990; Abb. 22).

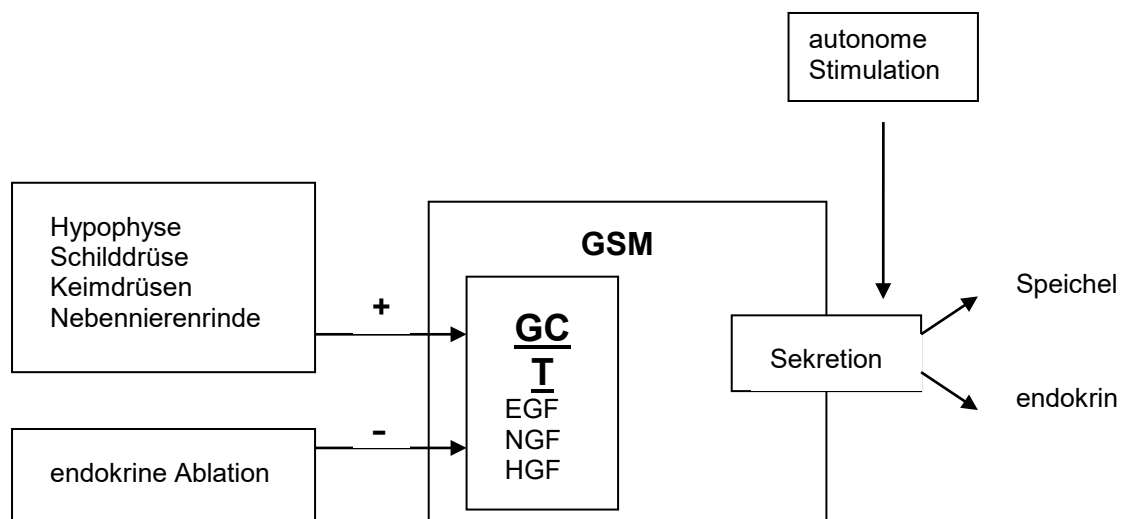


Abb. 22: Stark vereinfachte schematische Darstellung der endokrinen Steuerung und Leistungen der GSM der Ratte (nach Gresik 1994,1996; Mori 1992; Mathison 1994)

Das GCT-Kompartiment existiert nur in den GSM, verbindet Schaltstücke mit Streifenstücken und erweist sich immunhistochemisch als enzymarmes Gangsegment. Seine Differenzierung aus Stammzellen der Schaltstücke während der Geschlechtsreifung besonders bei männlichen Nagern (sog. Sexualdimorphismus), spricht bereits für eine hormonelle Steuerung. In diesem Sinne kann man auch die tageszeitliche Schwankung der Zellerneuerung auffassen. Wir fanden im Gegensatz zu den Azini tageszeitlich höhere Werte der GCT vormittags (4.1.4; Abb. 9). Dieses zirkadian inverse Verhalten der mitotischen Aktivität verschiedener Kompartimente eines Organs ist von der NNR bekannt (Danz et Bolck 1980).

In den letzten Jahren konnte experimentell nachgewiesen werden, daß Speichel-EGF für den Erhaltungszustand gastro-intestinalen Schleimhautepithels eine wesentliche Rolle spielt (Cossu et al. 2000; Stern et al. 2000).

Daher lag der Gedanke nahe, daß bei Störungen der GCT-Funktion, sei es nach einer zytotoxischen Läsion (z.B. durch AAF) oder Entfernung der GSM die Epithelproliferation des Gastro-Intestinal-Trakts beeinflußt werden könnte. Untersuchungen von Blaszyk und Hartmann (1991) ergaben jedoch, daß z.B. die Zellerneuerung der jejunalen Mucosa durch AAF, FEN und FON im Kurzzeitexperiment nicht alteriert wird. Dies gilt nach unseren Untersuchungen mit AAF, FEN oder FON auch für den Drüsenmagen, wo sich weder behandlungabhängige noch zirkadiane Einflüsse auf die Proliferation nachweisen ließen (vgl. Abb. 8 und 19).

Die oben beschriebene selektive zytotoxische Läsion der GCT durch AAF (Danz et al. 1997) deutet auf unterschiedliche metabolische Leistungen der einzelnen Gangabschnitte hin. Indirekt bestätigt sich dies auch biochemisch an GSM-Homogenaten, indem unterschiedliche CYP-Aktivitäten nach Behandlung der Tiere mit AAF oder Enzyminduktoren gemessen wurden (Lit. s. in Tab. 6).

Tab. 6: Darstellung der Induzierbarkeit von Cytochrom P450-Isoenzymen und Auswirkungen auf die AAF-Toxizität in den GSM

Verbindung	Enzyminduktion (+) Enzyminhibition (-)	Isoenzym	Einfluß auf AAF- Zytotoxizität
AAF	-	CYP A1/2	
3-Methylcholanthren ¹⁾	+	CYP 1A1	nicht untersucht
β-Naphtoflavon ²⁾	+	CYP 1A1/2	Abschwächung
Phenobarbital ^{1,2)}	Nein		Nein
7,8-Benzoflavon ¹⁾	-	CYP 1A1	nicht untersucht
SKF 525 A ³⁾	Nein		Nein

¹⁾ Murakami et al. 1986

²⁾ Jahn et al. 1997/98

³⁾ Danz et al. 2000

AAF allein führte zur Abnahme der CYP 1A1/2-Aktivität, was wahrscheinlich Ausdruck des Untergangs der GCT ist (vgl. Abb. 23). Die Kombination von BNF und AAF verhinderte den zytotoxischen Zellschaden (Jahn et al. 1998). Dies läßt vermuten, daß durch den Enzyminduktor BNF bereits in der Leber weniger

zytotoxische AAF-Metabolite entstehen. Dabei sind zwei Mechanismen vorstellbar:

1. der erhöhte Enzymgehalt nach Induktion metabolisiert quantitativ mehr potentiell zytotoxische Metaboliten zu "ungiftigen" Intermediaten (quantitativ veränderter Metabolismus)

oder

2. ein Nebenweg der Metabolisierung, der AAF zu nicht-zytotoxischen Metaboliten umsetzt, wird durch Enzyminduktion aktiviert (qualitativ veränderter Metabolismus)

Wir wissen nicht, ob solche metabolische Effekte wie nach AAF auf die endokrin aktiven GCT auch karzinogenrelevante Langzeitwirkung haben, abgesehen davon, daß auch noch andere EGF-Bildungsstätten beeinträchtigt sein könnten. Es wäre denkbar, daß neben direkten Wirkungen von Speichel-EGF auf gastrointestinales Epithel auch systemische Regulationsmechanismen auf endokrinem Weg beeinflußt werden.

Untersuchungen der EGF-Bindung und der EGF-Rezeptoren in der Rattenleber zeigten deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, GH-Sekretion der Hypophyse, Stoffwechselzustand usw. (Ekberg et al. 1989; Kashimata et al. 1989). Interessant ist, daß sowohl partielle Hepatektomie als auch intraportale EGF-Injektion die Expression intrahepatischer EGF-Rezeptoren erhöhen.

Daß Speichel-EGF bei der Regulation restaurativen Leberwachstums eine Rolle spielt, ist an submandibularektomierten Tieren gezeigt worden. Als „experimentum crucis“ könnte man in diesem Zusammenhang die Wirkung von AAF sehen. Dieses Kanzerogen führt nicht nur zu einer starken längerdauernden Mitoinhibition der Hepatozyten (Kempe 1995), sondern auch zu einer reduzierten Expression von EGF-Rezeptoren (DeCicco 1996). Erst in präneoplastischen Herden sind sie im Vergleich zum umgebenden Lebergewebe erhöht und wahrscheinlich für den selektiven Proliferationsvorteil der Präneoplasien mitverantwortlich (Johansson et al. 1990). In späteren Phasen der AAF-Kanzerogenese bzw. in manifesten Leberzellkarzinomen findet sich eine homogene Reduktion der EGF-Rezeptoren im gesamten Organ (DeCicco et al. 1996, 1997). Die Autoren halten den EGF-

Rezeptor sogar für einen dynamischen Marker während der Hepatokanzerogenese.

Bei Versuchen mit transgenen Mäusen, die EGF und TGF überexprimierten, entwickelten sich epitheliale Hyperplasien in Leber, intestinaler Schleimhaut und anderen Organen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß EGF und TGF mit hoher Wahrscheinlichkeit als endogene Mediatoren nach exogen-proliferativen Reizen beteiligt sind. Der qualitative Unterschied zwischen restitutivem und tumorprogressivem Wachstum müßte aber anderweitige Ursachen haben. EGF und TGF führen zwar zu vermehrter Zellteilung, scheinen aber für die maligne Transformation unwesentlich zu sein. Ihre Funktion bei der Kanzerogenese läßt sich in der mitogenen Stimulation initiiertter Zellen und Schaffung eines günstigen Milieus für entstehende Tumoren vermuten.

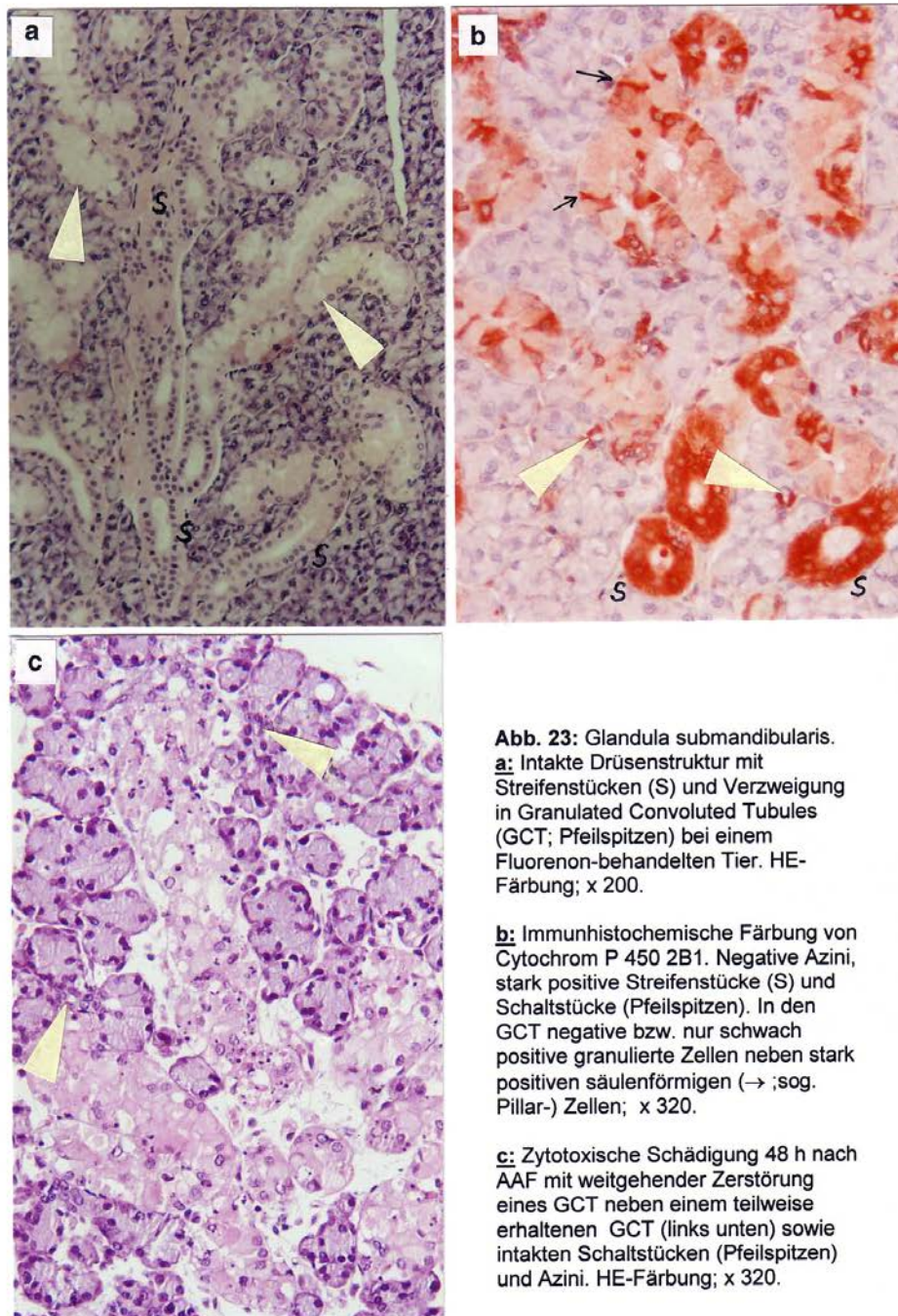


Abb. 23: Glandula submandibularis.

a: Intakte Drüsenstruktur mit Streifenstücken (S) und Verzweigung in Granulated Convoluted Tubules (GCT; Pfeilspitzen) bei einem Fluorenon-behandelten Tier. HE-Färbung; x 200.

b: Immunhistochemische Färbung von Cytochrom P 450 2B1. Negative Azini, stark positive Streifenstücke (S) und Schaltstücke (Pfeilspitzen). In den GCT negative bzw. nur schwach positive granulいたe Zellen neben stark positiven säulenförmigen (→ ; sog. Pillar-) Zellen; x 320.

c: Zytotoxische Schädigung 48 h nach AAF mit weitgehender Zerstörung eines GCT neben einem teilweise erhaltenen GCT (links unten) sowie intakten Schaltstücken (Pfeilspitzen) und Azini. HE-Färbung; x 320.

5.5. Physiologische und stimulierte Proliferation der Nebennierenrinde

Trotz der zentralen Stellung der NNR in zahlreichen regulativen, einschließlich adaptiv-physiologischen Prozessen ist über die Steuerung der adrenokortikalen Zellteilung verhältnismäßig wenig bekannt. Aus den Übersichtsarbeiten von Dallman (1984/85), Feige und Baird (1991) wird ersichtlich, daß die Zellteilung der äußerst proliferationsträgen NNR außerordentlich komplexen endokrinen und neuronalen Mechanismen unterliegt und, wie in anderen Organen, auch restitutiven Charakter hat, was bei einseitig adrenaletomierten und selbst hypophysektomierten Tieren nachgewiesen wurde. Für die funktionelle Integrität scheint die Zellvermehrung aber keine nennenswerte Rolle zu spielen. Selbst bei einseitig adrenaletomierten Tieren trägt die Zellvermehrung im verbliebenen Organ weniger als 2 % zum kompensatorischen Wachstum bei, das hauptsächlich durch Zellhypertrophie gewährleistet wird (Günther et al. 1969).

Einige experimentell nachgewiesene Proliferationsreize sind in Abb. 24 dargestellt.

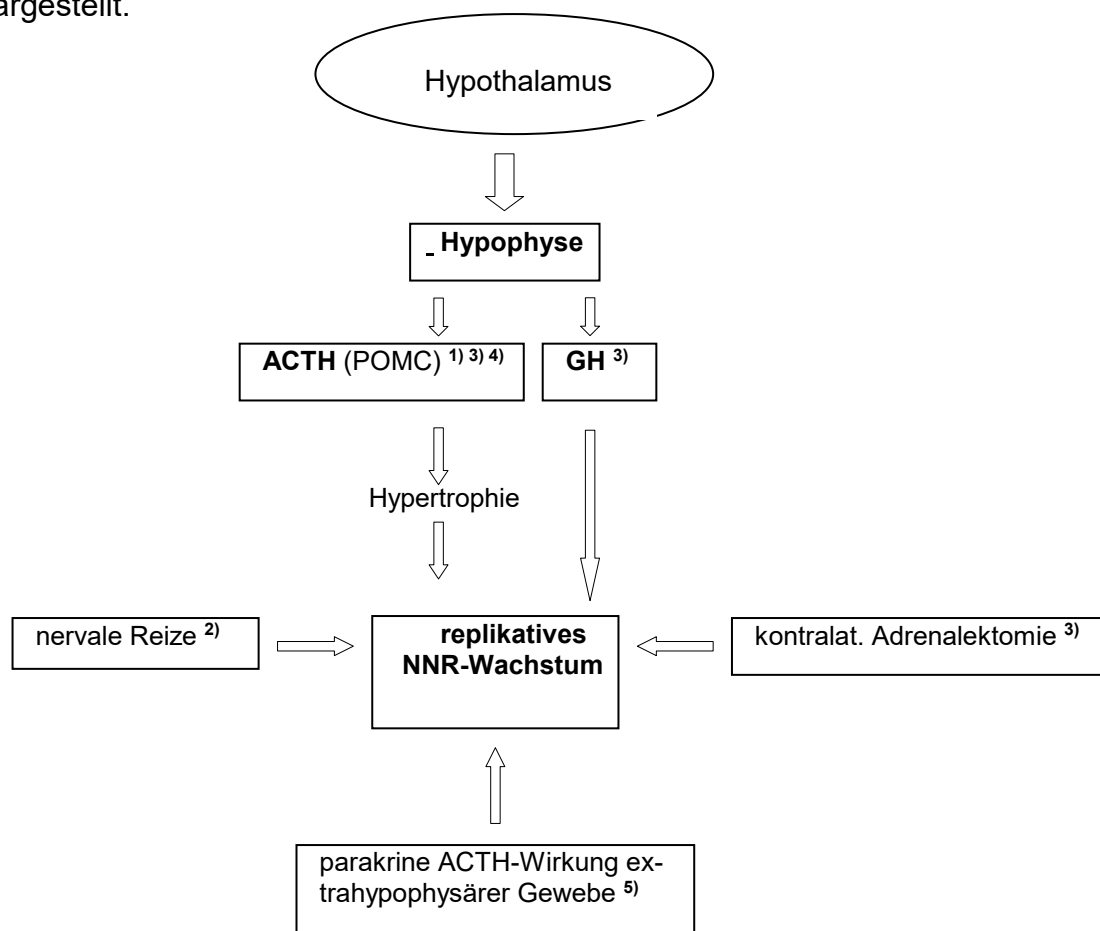


Abb. 24: Schematische Darstellung proliferativer Reize auf die NNR
(zusammengestellt nach folgenden Publikationen: ¹⁾ Belloni et. al. 1978 ; ²⁾ Lyson 1979 ;
³⁾ Dallman 1984 ; ⁴⁾ Arola et al. 1993 ; ⁵⁾ Tresguerres et al. 1998, Pawlikowski et al. 2001)

Die NNR erwachsener Säugetiere besitzt eine sehr niedrige physiologische Zellerneuerung, d.h. die Zellen der NNR haben eine hohe Lebenserwartung (Kataoka et al. 1996).

Zellneubildung erfolgt vorwiegend in der ZG und ZF mit zentripetaler Zellmigration in Richtung Zona reticularis und Nebennierenmark (vgl. Abb. 2). Somit scheint die Frage gerechtfertigt, ob die morphologische Zonierung der NNR tatsächlich streng an funktionelle Leistungen gebunden ist (Scheumann et al. 1996). Laut Literatur finden sich Hinweise für tageszeitliche Schwankungen der NNR-Proliferation mit einem Maximum am Vormittag (McNicol et al. 1989; Danz und Bolck 1980; Miyamoto et al. 2000). In unseren Versuchen ließen sich für die ZG und ZF zirkadiane Schwankungen nachweisen. Die ZG proliferierte vermehrt abends, während sich in der ZF in den Morgenstunden höhere Mitosezahlen fanden (4.1.2., Abb. 5). Die untersuchten Fluorenderivate führten in der ZF zu einer Verstärkung der tageszeitlich bedingt höheren Zellteilung in den Morgenstunden.

Das allgemein gefaßte Streß- und Adaptationskonzept nach Selye (1973) postuliert, daß man jeglicher Belastung eines Organismus (psychisch, physisch, Fremdstoffen) zwei Wirkungskomponenten zuordnen kann:

- erstens, eine unspezifische Streßwirkung und
- zweitens, eine dem Stressor inhärente spezifische Komponente.

Um näher zu bestimmen, wie die adaptiven Reaktionen auf die Fluorenderivate einzuordnen sind, untersuchten wir vergleichsweise die Wirkung einer einmaligen Dosis von Reserpin. Diese Substanz ist ein Antisymphotonikum und durch Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin und Dopamin in die Speichergranula ein pharmakologischer Stressor bzw. Aktivator der hypothalamo-hypophysär-adrenokortikalen Achse (Maickel et al. 1961). Nach wiederholter Gabe wirkt es auch mitogen auf Phäochromozyten des Nebennierenmarks und kann auch zu Phäochromozytomen führen (Tischler et al. 1989, 1995). In unserem Kurzzeit-Versuch führte schon eine Einzeldosis Reserpin zum Anstieg der Mitosen in Pars anterior (parallele Untersuchungen von A. Schmidt) und Pars intermedia der Hypophyse, zu selektiver Mitostimulation der ZG sowie zur

Thymolyse (vgl. Tab. 2; Abb. 10 und 12). Keiner dieser Reserpin-bedingten Effekte trat nach den Fluorenderivaten auf, die selektiv mitogen auf die ZF wirken. Man muß davon ausgehen, daß der zonal unterschiedlichen Reaktion der NNR auch unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Dafür gibt es folgende Hinweise:

- *Die mitotische Reaktion der Pars intermedia der Hypophyse fand sich nur nach Reserpin und könnte am ehesten als bisher nicht bekanntes Symptom eines unspezifischen Stresseffektes aufgefaßt werden. Aus der Literatur sind uns mit Ausnahme von Proliferationsstudien an der Pars intermedia während der postnatalen Entwicklungsphase (Carbajo et al. 1992, Taniguchi et al. 2000) keine einschlägigen Ergebnisse bekannt.*

- *Die mitotische Aktivität von ZG und ZF verläuft tageszeitlich invers. Die erhöhten ZG-Mitosen in den späten Abendstunden gehen mit höheren Serumspiegeln von ACTH und Glukokortikoiden als Ausdruck hypothalamo-hypophysär-adrenokortikaler Aktivierung einher, während die höhere mitotische Aktivität der ZF vormittags (Ruhephase der Tiere) mit dem zirkadian höheren GH-Spiegel korrespondiert (Lit. s. bei Danz und Bolck 1980; Ueberberg et al. 1982; Miyamoto et al. 2000).*

- *Analog zu diesen diurnalen Schwankungen führen auch tägliche physische Belastungen oder exogene ACTH-Zufuhr zu mehrtägiger Suppression der Zellteilung in der ZF, während sie mitostimulierend auf die ZG wirken (Kirillov 1973, Stachowiak et al. 1990). Diese Befunde sprechen zumindest für einen die ZF betreffenden Proliferations-Funktions-Dualismus. In diesem Zusammenhang sei nochmals hervorgehoben, daß die NNR nach den umfangreichen experimentellen Datenbasen kein Targetgewebe für die tumorerzeugende Wirkung von Kanzerogenen ist (Huff et al. 1991; Rosol et al. 2001).*

Die akute selektive Proliferation der ZF durch die tumorigenen Fluorenderivate, wie auch nach zahlreichen anderen Kanzerogenen ist offensichtlich ein 'spezifischer' Effekt substanzinhärenter Eigenschaften, der sich von der streßbedingten, unspezifischen Mitogenese der ZG unterscheidet. Berücksichtigt man ferner, daß FEN und FON im Gegensatz zum AAF keine zytotoxischen Wirkungen auf Speicheldrüsen haben, erscheint jedoch eine ursächliche Beziehung zwischen endokrinen Speicheldrüsenwirkungen und der reaktiven NNR-Proliferation unwahrscheinlich.

5.6. Einflüsse von Vincristin und Colchizin

Die lichtmikroskopische Erfassung von Mitosen ist eine verbreitete Methode zur Beurteilung der Proliferation von normalen und Tumorgeweben. Die Mitosefiguren sind nach Metaphasenarretierung durch Spindelgifte leichter erkennbar. Das Verhältnis der arretierten Metaphasen zur Anzahl der gleichzeitig gezählten Prophasen hängt im wesentlichen von der Wirkdauer des verabreichten Spindelgiftes ab. Bei zu langer Exposition kommt es zu Degeneration und Zerfall arretierter Metaphasen, was zwangsläufig zu einem Zählfehler führt. In der Literatur wird die optimale Latenz zwischen Gabe und Tötung je nach Applikationsart und Gewebe mit 2-5 Stunden angegeben (Wright und Appleton 1980).

Kritische Einwände gegen zu weitgehende proliferationskinetische Aussagen ergeben sich schon aus der Tatsache, daß Zählungen nach einem Zeitintervall (z.B. 3 h post injectionem) nur einen Momentanwert angeben, der kaum Rückschlüsse auf die Proliferationsdynamik (linear, exponentiell) zuläßt. Um diesbezüglich wenigstens eine grobe Aussage treffen zu können, haben wir auch die Häufigkeiten der einzelnen Mitosephasen (Pro-, Meta-, Ana-/Telophasen) bestimmt.

Häufig verwendete blockierende Substanzen sind Vinca Alkaloide (Vinblastin, Vincristin) und das Gift der Herbstzeitlosen (Colchicum autumnale - Colchizin). Die optimale Dosierung sollte in einem Bereich liegen, der gerade den Übertritt in die Anaphase und damit die Karyokinese verhindert, ohne die Zellen toxisch zu schädigen oder vorausgehende Zellzyklusphasen zu beeinträchtigen (Wright, Appleton 1980). Für Colchizin wird eine optimale Dosis von 3 mg/kg KG angegeben. Bei Vincristin beträgt die LD₅₀ (Maus, i.v.) 2 mg/kg KG (Marquardt und Schäfer 1994). In unseren Versuchen betrug die subkutan verabreichte Dosis Vincristin etwa 0,4 mg/kg KG.

Colchizin und Vincristin unterscheiden sich in ihrem Wirkungsmechanismus. Colchizin hemmt die Tubulinaggregation zum Spindelapparat durch Konformationsänderung, ist unabhängig von den Microtubule-assoziierten Proteinen (MAP's) und wirkt in Konzentrationen weit unterhalb der stöchiometrischen Tubulinkonzentration (substöchiometrische Hemmung). Lichtmikroskopisch imponieren große Zellen mit hellem Zytoplasma und fragmentierten, unregelmäßig verteilten Chromosomen (vgl. Abb. 2 und 13). Vincristin dagegen wirkt nur in

Anwesenheit der MAP's. Es wird in den Spindelapparat eingebaut und führt zu Strukturanomalien, die eine korrekte Funktion des Spindelapparates stören. Die Wirkung hängt maßgeblich vom Konzentrationsverhältnis Tubulin zu Vincristin ab (Hamel 1996; vgl. Abb. 1).

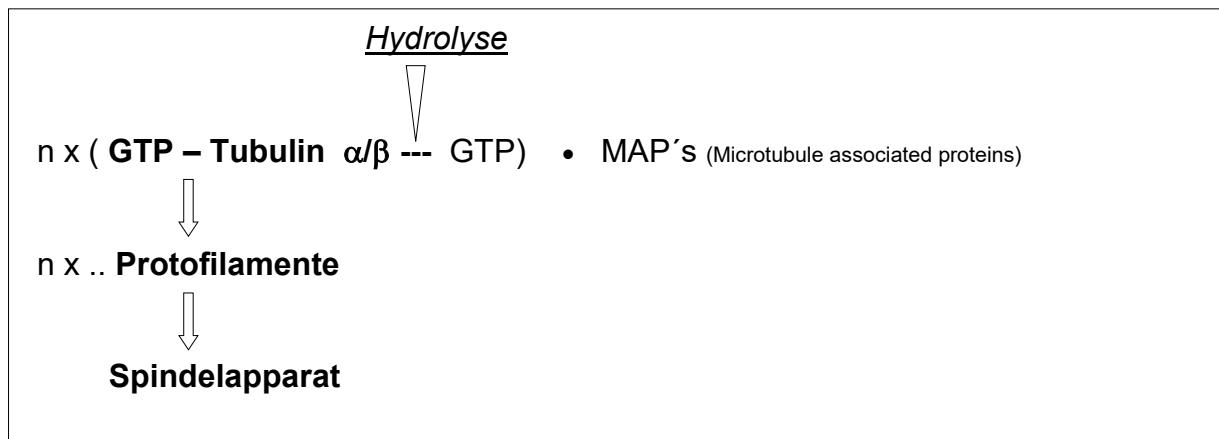


Abb. 25: Schematische Darstellung der Spindelaggregation während der Mitose nach Hamel (1996)

Die Resultate unserer Versuche zeigen, unabhängig von der Tageszeit, eine zuverlässige Wirkung des Vincristins auf die Metaphasenarretierung in Drüsenmägen, Speicheldrüsen und in der ZG der Nebennieren (s. 4.1.). In der ZF, die einen tageszeitlichen Proliferationsrhythmus aufweist, ist die Vincristinwirkung bei tageszeitlich verstärkter Proliferation am Morgen effektiver (4.1.2.). Dabei fanden sich jedoch vermehrt Ana-/Telophasen, so daß in Kenntnis der physiologischen Proliferationsschwankungen gegebenenfalls die Dosis tageszeitabhängig angepaßt werden müßte.

Der Colchizineffekt war in den Drüsenmägen, Hypophysenzwischenlappen und ZG in gleicher Weise sichtbar. In der ZF unterschied sich jedoch die Anzahl der Mitosen bei den blockierten und unblockierten Versuchsgruppen nicht. Überraschend war, daß nach Vorbehandlung mit FEN eine Blockade durch Colchizin eintrat, die Gesamtzahl der Mitosen jedoch signifikant erniedrigt war (4.2.2.; 4.3.2.; Abb. 16). Bei Erfassung der einzelnen Mitosephasen zeigte sich, daß Ana-/Telophasen nahezu durchgehend fehlten. Demnach wirkt das Colchizin auch in der ZF blockierend, führt aber zu einer Mitoinhibition.

Ob die Zunahme der relativen Lebermasse, die typisch für hepatische Enzyminduktoren ist, bereits 3 Stunden nach Colchizin ebenfalls durch Induktionseffekte bedingt war, konnte hier nicht geklärt werden. Es bleibt offen, ob

es sich um einen additiven, kurzzeitigen Effekt nach Vorbehandlung mit AAF bzw. FEN oder um ödematöse Prozesse handelt. Erwähnenswert sei, daß in beiden Versuchsgruppen auch das relative Nebennierengewicht signifikant zunahm. Diese Wirkung ist kaum Folge einer erhöhten Zellteilung (vgl. Tab. 4 und Abb. 16), da die Mitosezahl in den colchizinblockierten AAF- bzw. FEN-behandelten Gruppen signifikant erniedrigt war. In welcher Zyklusphase die Zellteilung nach kombinierter Behandlung gehemmt wurde, ist aus unseren Versuchen nur indirekt abzuleiten. Die signifikant niedrigere Prophasenzahl bei den colchizinblockierten FEN-Tieren (s. 4.3.2.; Abb. 17) spricht jedoch dafür, daß der Zellteilungsprozeß in der späten S-Phase und/oder in der G₂-Phase beeinflusst wird (Abb. 26).

Auch nach der Kombination von AAF und Colchizin lag die Gesamtzahl der Mitosen auf Kontrollniveau, jedoch im Unterschied zu FEN mit vergleichbarem Prophasenanteil. Dies resultiert am ehesten aus einer Verlängerung der Prophase (vgl. 4.2.2.; Abb. 10 und 11).

Wenn man von der geringen Tieranzahl absieht, entsprechen die Befunde nach kombinierter Behandlung von FON mit Vincristin den üblichen Erwartungen einer erhöhten Mitosezahl der ZF nach Blockierung.

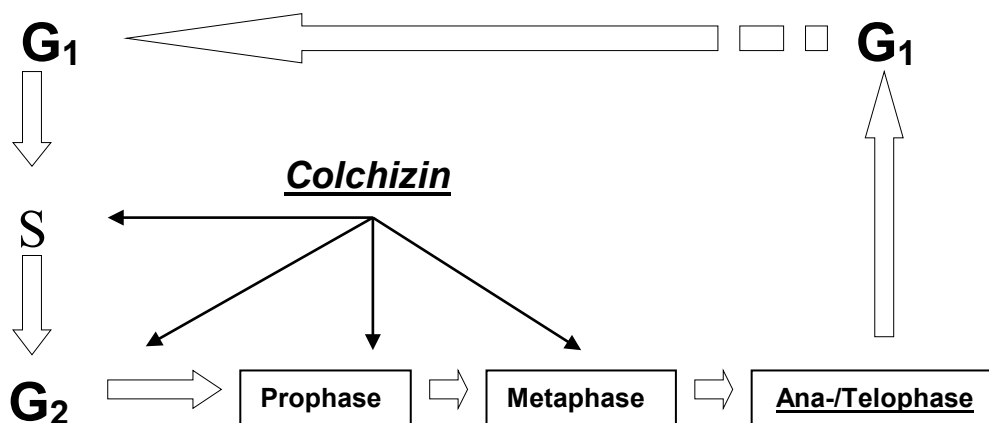


Abb. 26: Darstellung der Colchizinwirkung (Hemmung bzw. zeitliche Verzögerung) im Ablauf der Zellzyklusphasen in der Zona fasciculata

Daraus läßt sich zusammenfassend folgendes ableiten:

a) Bei Vincristin und Colchizin läßt sich in allen untersuchten Geweben (Drüsenmagen, NN, Speicheldrüsen, Hypophysenmittellappen) ein blockierender Effekt nachweisen.

b) Die ZF der NNR verhält sich abweichend :

Die mitogene Wirkung von FEN und AAF wird bei Kombination mit Colchizin aufgehoben im Gegensatz zur Kombination von FON und Vincristin.

c) Colchizin scheint auch in niedriger Dosierung den Ablauf der Zellzyklusphasen in der ZF zu beeinträchtigen.

d) Colchizin führte in Kombination mit AAF und FEN zu einer signifikanten Erhöhung der relativen NN-Gewichte (vgl. Tab. 4).

e) Bei Vincristin ließen sich in keinem untersuchten Gewebe Einflüsse auf den Ablauf der Zellzyklusphasen feststellen.

6. Zusammenfassung

Die Kanzerogenese ist ein komplexer Prozeß, der bestimmten Gesetzmäßigkeiten unterliegt. Ein initialer kritischer Zellschaden (Initiation) entwickelt sich über bestimmte präneoplastische Veränderungen (Promotionsphase) zum manifesten Tumor (Progression). Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die nach initialer Schädigung mit zeitlicher Latenz letztendlich zum Tumor führen, sind noch wenig bekannt. Insbesondere die Promotionsphase, die Jahre bis Jahrzehnte dauern kann, läßt sich aufgrund der Vielzahl auf systemischer Ebene wirkender Faktoren schwer erfassen. Auch unter experimentellen Bedingungen ist die Induktion maligner Neoplasien zeit- und kostenaufwendig. Daher war man in den letzten Jahrzehnten bemüht, vorwiegend Kurzzeit-Screenings zur Identifizierung krebserzeugender Stoffe zu entwickeln. Mit in-vitro-Tests an Zellkulturen oder Bakterienstämmen können mutagene (genotoxische) Eigenschaften der Testsubstanzen erkannt werden. Durch die Erkenntnis, daß Genotoxizität nicht zwangsläufig mit Kanzerogenität einhergeht und diese Tests nichtgenotoxische Kanzerogene nicht zu dedektieren vermochten, waren sie in ihrer Aussagefähigkeit stark eingeschränkt. Dies ist insofern hervorzuheben, da nichtgenotoxische Kanzerogene auch als Realisatoren der Kanzerogenese unter natürlichen Bedingungen angesehen werden müssen. Im Gegensatz zu den genotoxischen Kanzerogenen kann davon ausgegangen werden, daß nichtgenotoxische Kanzerogene über epigenetische Mechanismen (Wachstumsfaktoren, Hormone) die Zellteilung stimulieren und Differenzierungsvorgänge beeinflussen.

Da auch Initiations-Promotions-Experimente (sog. Medium-Term-Tests, d.h. kombinierte sequentielle Behandlung mit Initiatoren und Promotoren) relativ viel Zeit in Anspruch nehmen, erschien es sinnvoll, nach Veränderungen zu suchen, die schon kurz nach Kanzerogenexposition nachweisbar sind und möglicherweise auf den kanzerogenen Prozeß hinweisen. Auf der Grundlage vorausgegangener Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß bestimmte biologische Wirkungen von Kanzerogenen schon nach kurzer Zeit (Tage bis einige Wochen) nachweisbar sind. Genotoxische Kanzerogene führen in nicht zytotoxischen Dosen initial zu einer temporären Hemmung der Zellteilung in ihrem Targetgewebe, während nichtgenotoxische Kanzerogene (Promotoren) primär mitogen wirken. Aus diesem Grund wurde in vorliegender Arbeit untersucht, ob bei dem hepatotropen, genotoxischen AAF und dessen promotorischen Strukturanaloga FEN und FON außerhalb des Targetorgans ähnliche Effekte nachweisbar sind.

Neben ihrer gegensätzlichen akuten Wirkung auf die Zellteilung im Targetgewebe (Leber) führten beide Kanzerogentypen zu einer additiven Zellvermehrung in der NNR, obwohl diese gegenüber tumorerzeugenden Wirkungen von Xenobiotika sehr resistent ist. Möglicherweise wird diese Reaktion erst durch die Kanzerogenexposition des eigentlichen Targetgewebes (Leber) in Gang gesetzt und durch die Induktion endogener Wachstumsfaktoren realisiert. Im Zusammenhang mit der systemischen Steuerung der adrenokortikalen Zellerneuerung und ihrer zirkadianen Variabilität haben wir untersucht, a) ob Kanzerogene den zirkadianen Rhythmus der Zellteilung beeinflussen und b) ob die kanzerogeninduzierte adrenokortikale Zellvermehrung einem unspezifischen Streß-Effekt entspricht.

Sowohl in der ZG als auch in der ZF der NNR ließen sich zirkadiane Proliferationsschwankungen nachweisen. Tageszeitlich höhere Mitosezahlen der ZF traten in den Morgenstunden auf, während die ZG abends (12 h später) stärker proliferierte. Die Fluorenderivate wirkten selektiv mitogen auf die ZF. Dieser Effekt war morgens, also im tageszeitlichen Proliferationshoch (Ruhephase der Tiere) sichtbar, d.h. zu einer Zeit, in der der GH-Serumspiegel tageszeitlich erhöht ist. Unsere Untersuchungen ergaben ferner eine selektive Mitostimulation der ZG und des Hypophysenmittellappens durch den pharmakologischen Stressor Reserpin,

was sich nach den Fluorenderivaten nicht fand. Dies legt nahe, daß die kanzerogeninduzierte ZF-Proliferation keine unspezifische Streßreaktion ist. Ein weiterer Effekt, der auf eine systemische Auseinandersetzung mit dem Kanzerogen hinweist, ist der schon nach einmaliger AAF-Gabe nachweisbare, selektive Zelluntergang in der GCT der GSM. Insbesondere bei Nagern sind Speicheldrüsen endokrin aktive Organe und in systemische Regulationskreise einbezogen. Ihre endokrine Aktivität zeigt sich an dem hohen Gehalt an Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (EGF, NGF, HGF, IGF-I), die u.a. für die Integrität gastro-intestinaler Schleimhaut von Bedeutung sind. Diese experimentellen Ergebnisse führten zu folgenden drei Fragestellungen:

- a) unterliegt die Proliferation der einzelnen Speicheldrüsenkompartimente tageszeitlichen Einflüssen,
- b) führen auch die strukturanalogen FEN und FON zu mikroskopisch sichtbaren Veränderungen in den GCT,
- c) haben die GCT-Schäden durch AAF Auswirkungen auf die Proliferation der Magenschleimhaut ?

Die Untersuchungen ergaben, daß die GCT morgens stärker proliferieren als am Abend. Für die Azini ließ sich keine Tagesrhythmik finden. Im Gegensatz zu AAF traten nach Behandlung mit FEN und FON keine zytotoxischen Schäden weder in den GCT noch in anderen Kompartimenten der GSM auf.

Die Fluorenderivate beeinflussten das Zellteilungsverhalten der Magenschleimhaut nicht. Selbst eine Sialadenektomie hatte keine faßbaren akuten Auswirkungen auf gastrale Epithelproliferation. Vorstellbar wäre, daß das Fehlen sialogener Wachstumsfaktoren erst nach zeitlicher Latenz faßbar wird und uns in diesen Kurzzeit-Experimenten entgangen ist.

Ein weiteres Anliegen vorliegender Arbeit war die Frage, ob die Spindelgifte Vincristin und Colchizin gleiche Wirkung auf unterschiedliche Gewebe haben. Beide Substanzen werden zur Metaphase-Arrest-Technik bei Proliferationsstudien verwendet. Sie blockieren den Mitoseablauf in der Metaphase, die lichtmikroskopisch am deutlichsten zu erkennen ist.

Beide Substanzen wirkten in allen untersuchten Geweben blockierend. Allerdings war diese Wirkung bei tageszeitlich- bzw. behandlungsbedingter erhöhter Zellproliferation ausgeprägter. Daß sich in den Phasen verstärkter Zellteilung tendenziell vermehrt Ana-/Telophasen fanden, spricht dafür, daß die blockierende

Wirkung unvollständig sein muß. Dies läßt vermuten, daß auch die Wirksamkeit der Metaphasenblocker tageszeitlichen Einflüssen unterliegt, möglicherweise durch metabolische Variabilität. Ob dies tatsächlich der Fall ist, müßte mit tageszeitlich unterschiedliche Dosierungen untersucht werden.

Hervorzuheben ist, daß sich die ZF der NNR im Vergleich mit anderen Geweben abweichend verhält. Anstelle der zu erwartenden blockierungsbedingten Zunahme der Mitosezahl, wurden nach kombinierter Behandlung mit AAF bzw. FEN und Colchizin niedrigere Mitosezahlen gefunden. Dies ist am ehesten durch metabolische Interferenzen der Substanzen zu erklären. Nach Analyse der Häufigkeit der einzelnen Mitosephasen ergeben sich indirekte Hinweise dafür, daß Colchizin vor der Metaphasenblockade bereits in den Ablauf der S- oder G₂-Phase (nach FEN) bzw. der Prophase (nach AAF) eingreift.

In Anbetracht dieser Ergebnisse sollte Colchizin nur dort angewandt werden, wo die zuverlässige Wirkung bekannt ist. Andernfalls könnten Substanzwirkungen durch den Einsatz von Metaphasenblockern maskiert und damit Ergebnisse erheblich verzerrt werden.

Im Gegensatz zu Colchizin fanden wir nach Vincristin keinen Hinweis, daß es den Ablauf des prä-metaphasischen Zellzyklus wesentlich beeinflusst. Daher erscheint es zu Proliferationsstudien besser geeignet als Colchizin.

Literaturverzeichnis

AMANO, O.; TSUIJ, T.; NAKAMURA, T.; ISEKI, S.: Expression of transforming growth factor beta 1 in the submandibular gland of the rat. J. Histochem. Cytochem. 39(12), 1707-11 (1991)

AMANO, O.; ISEKI, S.: Expression and localisation of cell growth factors in the salivary gland: a review. Kaibogaku Zasshi 76(2), 201-12 (2001)

AMLACHER, E.; DANZ, M.; URBAN, H.; STILLER, K.J.: Dimethylsulphoxide as a solvent in carcinogen application with regard to the proliferative activity of the adrenal cortex. Exp. Path. 9, 302-6 (1974)

ARANCIBIA, S.; ASSENMACHER, I.: Submaxillary glands in an endocrine context. J. Biol. Buccale 13(3), 185-203 (1985)

AROLA, J.; HEIKILLA, P.; KAHRI AL: Biphasic effect of ACTH on growth of rat adrenocortical cells in primary culture. Cell Tissue res. 271(1), 169-76 (1993)

ASAMOTO, M.; TSUDA, H.; KATO, T.; ITO, N.; MASUKO, T.; HASHIMOTO, Y.; NAGASE, S.: Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis: immunohistochemical analysis of cytochrome p-450 isozyme induction by 2-acetylaminofluorene and phenobarbital. Jpn. J. Cancer Res. 80(11), 1041-6 (1989)

ASHBY, J.; SERRES, M.; DRAPER, M.; ISHIDATE jr., M.; MARGOLIN, B.; MATTER, B.E.; SHELBY, M.D.: Evaluation of short-term-tests for carcinogens. Report of the international programme on chemical safety's collaborative study on in-vitro assays. Progress in Mutation Research, vol. 5, Elsevier Science Publishers Amsterdam-Oxford-New York (1985)

ASHBY, J.: Origins of current uncertainties in carcinogen / mutagen screening. Environ. Mol. Mutagen. 14, Suppl. 16, 51-9 (1989)

AYRTON, A.D.; MCFARLANE, M.; WALKER, R.: The induction of of P 450 I proteins by aromatic amines may be related to their carcinogenic potential. Carcinogenesis 11, 803-9 (1990)

BAAK, J.P.A.: Editorial: Mitosis counting in tumors. Hum. Pathol. 11, no. 7, 683-5 (1990)

BARKA, T.: Biologically active polypeptides in submandibular glands. J. Histochem. Cytochem. 28, 836-59 (1980)

BARRETT, J.C.: Mechanisms of multistep carcinogenesis: keys to developing in vitro approaches for assessing the carcinogenicity of chemicals. Food Chem. Toxicol. 24(6-7), 657-61 (1986)

BARRETT, J.C.: Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. Environm. Health. Perspect. 76, 65-70 (1987)

BARTSCH, H.: Metabolic activation of aromatic amines and azo dyes. IARC Sci. Publ. 1981(40), 13-30

BEIJE, B.; MOELLER, L.: 2-Nitrofluorene and related compounds: Prevalence and biological effects. Mutat. Res. 196, 177-209 (1988)

BELLONI, A.S.; MAZZOCCHI, G.; MENEGHELLI, V.; NUSSDORFER, G.G.: Cytogenesis in the rat adrenal cortex: evidence for an ACTH-induced centripetal cell migration from the zona glomerulosa. Arch. Anat. Histol. Embryol. 61, 195-205 (1978)

BLASZYK, H.; HARTMANN, A.: Promoting-Activity-Test. Mitogene Wirkung von Xenobiotika als Indikator ihrer tumorigenen Potenz in einem in vivo-Kurzzeittestsystem. Dissertation A. FSU-Jena 1991

BRAEUER, R.; DANZ, M.; URBAN, H.; WALDMANN, G.: Thymocyte stimulating activity of the serum of rats in early phase after 2-acetyaminofluorene (AAF) treatment. Arch. Toxicol. 4, 156-8 (1980)

BROUNS, R.M.; VAN DOORN, R.; BOS, R.P.; MULLENERS, L.J.; HENDERSON, P.T.: Metabolic activation of 2-Aminofluorene by isolated rat liver cells through different pathways leading to hepatocellular DNA-repair and bacterial mutagenesis. Toxicology 19(1) 67-75 (1981)

BUENING, H.; TRENKLER, G.: Nichtparametrische statistische Methoden. DeGruyter Berlin, New York (1978)

BUTTERWORTH, B.E.: Nongenotoxic carcinogens in the regulatory environment. Regul. Toxicol. Pharmacol. 9(3), 244-56 (1989)

BUTTERWORTH, B.E.: Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. Mutat. Res. 239(2), 117-32 (1990)

BUTTERWORTH, B.E.: Chemically induced cell proliferation as a predictive assay for potential carcinogenicity. In: Chemically induced cell proliferation: Implication for risk assessment. Wiley-Liss, Inc., 457-67 (1991)

BUTTERWORTH, B.E.; BOGDANFFY, M.S.: A comprehensive approach for integration of toxicity and cancer risk assessments. *Regul. Toxic. Pharmacology* 29(1), 23-6 (1999)

CARBAJO S.; HERNANDEZ J.L.; CARBAJO-PEREZ E.: Proliferative activity of cells of the intermediate lobe of the rat pituitary during the postnatal period. *Tissue Cell* 24(6), 829-34 (1992)

CLAYSON, D.B.; NERA, E.A.; LOK, E.: The potential for the use of cell proliferation studies in carcinogen risk assessment. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 9, 284-95 (1989)

COSSU, M.; PERRA, M.T.; PILUDI, M.; LANTINI, M.S.: Subcellular localisation of epidermal growth factor in human submandibular gland. *The Histochem. Journ.* 32(5), 291-4 (2000)

CURT, G.A.: Cancer drug development: New targets for cancer treatment. *Oncologist* 1996; 1(3): II-III

DALLMAN, M.F.: Control of adrenocortical growth in vivo. *Endoc. Res.* 10 (3,4), 213-42 (1984-85)

DANZ, M.; URBAN, H.; SCHMIDT, A.; ZIEBARTH, D.: A possible short-term prediction of potential carcinogenicity of chemical compounds in vivo by means of a promoting activity test (PAT). *Exp. Path.* 16, 109-20 (1978) a

DANZ, M.; KLINGER, W.; MUELLER, D.; KLEEGERG, U.; GLOECKNER, R.; ZIEHBARTH, D.; URBAN, H.: N,N-diethyl-4-aminoazobenzene (DEAB): acute actions with respect to possible carcinogenicity as well as the role of solvents. Morphological and pharmacological investigations. *Exp. Path.* 16, 245-53 (1978)b

DANZ, M.; URBAN, H.; SCHMIDT, A.: Growth stimulation following serum transfer from carcinogen-treated donors to normal rats: a new aspect of early carcinogen actions. *Exp. Pathol.* 16, 23-35 (1978)c

DANZ, M.; URBAN, H.: Elevated mitotic number in the adrenal cortex as a reflection of the early events in the growth induction by carcinogens and promoters – a possible short-term assay. *Arch. Toxicol.* 4, 19-21 (1980)a

DANZ, M.; BOLCK, F.: Stimulation of adrenal cell proliferation in normal rats by carcinogen-induced serum factors. *Exp. Pathol.* 18, 414-22 (1980)b

DANZ, M.; BRÄUER, R.: Carcinogenic and non-Carcinogenic fluorene derivatives: induction of thymocyte stimulating serum factors by 2-acetylaminofluorene (AAF) and their synergy with lymphocyte mitogens. *Exp. Pathol.* 34, 217-21 (1988)

DANZ, M.; HARTMANN, M.; OTTO, M.; BLASZYK, H.: Hitherto unknown additive growth effects of fluorene and 2-acetylaminofluorene on bile duct epithelium and hepatocytes in rats. Arch. Toxicol. Suppl. 14, 71-5 (1991)

DANZ, M.; MUELLER, D.; RAETHE, H.: Fluorene and 2-benzoylfluorenone : different short-term effects on drug metabolizing liver enzymes and on cell proliferation. Exp. Pathol. 44, 259-61 (1992)

DANZ, M.; SAENGER, J.; FRIEDRICHSEN, K.; LINSS, W.: 2-Acetylaminofluorene-produced selective cytotoxic damage of a ductal compartment and its repair in the submandibular gland of rats. Cell Tissue Res. (1997)

DANZ, M.; HARTMANN, A.; BLASZYK, H.: Mitogenic short-term effects on hepatocytes and adrenocortical cells: phenobarbital and reserpine compared to carcinogenic and non-carcinogenic fluorene derivates. Exp. Toxicol. Pathol. 50, 416-24 (1998)

DANZ, M.; LUPP, A.; LINSS, W.: The granulated convoluted tubules of the rat submandibular glands under experimental conditions. Ann. Anat. 181, 133-7 (1999)

DANZ, M.; LUPP, A.: Immunohistochemical demonstration of cytochrome P 450 isoforms in the submandibular gland of carcinogen-treated rats. Cancer Detection and Prevention, Vol. 24, Supplement 2000, Ref. 412

DEAN, D.H.; HIRAMOTO, R.N.: Decreased plasma testosterone and total thyroxine in desalivated male rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62(5), 565-8 (1984)

DeCICCO, L.A.; PANZETER, P.L.; CASHMAN, R.E.; RINGER, D.P.: Changes in the binding capacity of hepatic membrane s for epidermal growth factor during multistage hepatocarcinogenesis in rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 228(1), 69-74 (1996)

DeCICCO, L.A.; KONG, J.; RINGER, D.P.: Carcinogen - induced alteration in liver epidermal growth factor receptor distribution during the promotion stage of hepatocarcinogenesis in rat. Cancer Lett. 111(1-2), 149-56 (1997)

DeCLOITRE, F.; LAFARGE-FRAYSSINET, C.; BORROSO, M.; LECHNER, M.C.; OULDELHKIM, M.; FRAYSSINET, C.: Effect of rat developmental stage at initiation on the expression of biochemical markers during liver tumor promotion. Tumor Biol. 11, 295-305 (1990)

DONATH, K.: Sialadenosis of the parotid gland. Ultrastructural, clinical and experimental findings in disturbances of secretion. Verhoff Pathol. 1976 (103), 1-122

EKBERG, S.; CARLSSON, L.; CARLSSON, B.; BILLIG, H.; JANSSON, J.O.: Plasma growth hormone pattern regulates epidermal growth factor (EGF) receptor messenger ribonucleic acid levels and EGF binding in rat liver. *Endocrinology* 125(4), 2158-66 (1989)

FARBER, E.: The pathology of experimental liver cell cancer. In: Cameron, H.M.; Linsell, D.A.; Warwick, G.P. (eds.). *Liver cell cancer*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 243-77 (1976)

FARMER, J.H.; KODELL, R.L.; GREENMAN, D.L.; SHAW, G.W.: Dose and time responses models for the incidence of bladder and liver neoplasms in mice fed 2-acetylaminofluorene continuously. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 3(3), 55-68 (1980)

FEIGE, J.J.; BAIRD, A.: Growth factor regulation of adrenal cortex growth and function. *Progr. Growth Factor Res.* 3, 103-13 (1991)

GERLYNG, P.; SEGLEN, P.O.: Effects of the tumour promoter 2-acetylaminofluorene and of 4-acetylaminofluorene on rat liver growth. *Bull. Cancer.* 77, 461-6 (1990)

GRASSO, P.; HINTON, R.H.: Evidence for possible mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis in rodent liver. *Mutat. Res.* 248(2), 271-90 (1991)

GRESIK, E.: The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microscopy Res. Tech.* 27, 1-24 (1994)

GRESIK, E.W.; HOSOI, K.; KURIHARA, K.; MARUYAMA, S.; UEHA, T.: The rodent granular convoluted tubule cell - an update. *Europ. Journ. of Morph.* Vol. 34, no. 3, 221-4 (1996)

GUENTHER, G.; HUEBNER, K.; SCHNEIDER, E.: Die quantitative Bedeutung der Mitosen bei kompensatorischem Wachstum der Leber und der Nebennierenrinde. *Beitr. Path. Anat.* 139, 261-74 (1969)

HADJIOLOV, N.; BITSCH, A.; NEUMANN, H.G.: Early initiating and promoting effects in 2-AAF induced rat liver carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Cancer Lett.* 98(1), 39-46 (1995)

HAMBURGER, V.: The History of the Discovery of the Nerve Growth Factor, *Journ. of Neurobiol.* Vol 24, No. 7, 893-7 (1993)

HAMEL, E.: Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. *Med. Res. Rev.*, 16(2), 207-31 (1996)

HIRAMATSU, M.; KASHIMATA, M.; MURAYAMA, M.; UI, K.; TSUBAKIDA, K.; MINAMI, N.: Effects of sialadenectomy and epidermal growth factor administration on the duodenum of adult mice. *Biochem. Int.* 21(4), 753-60 (1990)

HOFFMANN, D.; RATHKAMP, G.: Quantitative determination of fluorens in cigarette smoke and their formation by pyrosynthesis. *Anal. Chem.* 44, 899-905 (1972)

HOLME, J.A.; SOEDERLUND, E.J.; CHRISTENSEN, T.; TRYGG, B.; BJÖRNSTAD, C.: Modulation of cytotoxic and genotoxic effects of 2-acetylaminofluorene in rat and hamster hepatocytes by 3-methylchlorantrene pretreatment. *Carcinogenesis* 7; no. 9, 1561-7 (1986)

HUFF, J.; CIRVELLO, J.; HASEMAN, J.; BUCHER, J.: Chemicals associated with site-specific neoplasia in 1394 long-term carcinogenesis experiments in laboratory rodents. *Environ. Health. Perspect.* 93, 247-70 (1991)

INO, M.; USHIRO, K.; INO, C.; YASHIMATA, T.; KUMAZAWA, T.: Kinetics of epidermal growth factor in saliva. *Acta Otolaryngol. Suppl. Stockh.* 500, 126-30 (1990)

JAHN, F.; PLANZ, N.; DANZ, M.; MUELLER, D.: Influence of 2-acetylaminofluorene (2-AAF) on biotransformation and lipid peroxidation in salivary glands and liver from male rats. *Exp. Toxic. Pathol.* 50, 465-71 (1998)

JOHANSSON, S.; ANDERSSON, G.: Similar induction of the hepatic EGF receptor in vivo by EGF and partial hepatectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166(2), 661-6 (1990)

JONES, H.B.; ELDRIDGE, S.R.; BUTTERWORTH, B.E.; FOSTER, J.R.: Measures of cell replication in risk/safety assessment of xenobiotic-induced, non-genotoxic carcinogenesis. *Regul. Toxic. Pharmacol.* 23(3), 117-27, (1996)

KAKIZAKI, G.; SASAHARA, M.; SAITO, T.; SOENO, T.; FUJIWARA, Y.: Experimental studies on the pathophysiological changes in the pancreas of rat following bilateral ligation of the parotid gland duct. *Tohoku J. Exp. Med.* 118(4), 331-48 (1976)

KASHIMATA, M.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N.: Differential secretory rhythm of growth hormone controls the number of hepatic epidermal growth factor receptors in the rat. *J. Endocrinology* 123(1), 75-81 (1989)

KASUGAI, K.; JOH, T.; KATAOKA, H.; KATO, T.; ITOH, M.: Effects of anti-gastric secretory drugs IT-066 and omeprazole mitogenic activities in the gastric juice of the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 31(2), 111-7 (1996)

KATAOKA, Y.; IKEHARA, Y.; HATTORI, T.: Cell proliferation and renewal of mouse adrenal cortex. J. Anat. 188(2), 375-81 (1996)

KEMPE, C.: Frühwirkung und Interaktion genotoxischer und nichtgenotoxischer Kanzerogene auf das Teilungswachstum von Rattenhepatocyten in vivo. Dissertation A. FSU - Jena 1995

KIRILLOV, O.I.: Cell mechanisms of stress (russ.). Far East Publishing House, Vladivostok (1973)

KLOPMAN, G.; FRIERSON, M.R.; ROSENKRANZ, H.S: The structural basis of the mutagenicity of chemicals in salmonella typhimurium: The gene-tox data base. Mutat. Res. 228, 1-50 (1990)

KOERKER, R.M.: The effects of hypophysectomy on the digestive glands of the mouse. Am. J. Anat. 121(3), 571-600 (1967)

LAMBOTTE, L.; SALIEZ, A.; TRIEST, S.; MAITER, D.; BARANSKI, A.; BARKER, A.; LI, B.: Effect of sialadenectomy and epidermal growth factor administration on liver regeneration after partial hepatectomy. Hepatology, Vol.25, No. 3, 607-11 (1997)

LOHSE, L.; LUDWIG, R.: Prüfstatistik. 1. Auflage, Fachbuchverlag Leipzig (1982)

LYSON, K.: Pilocarpine and atropine effects on the mitotic activity of the adrenal cortex. Endokrinologie 73(3), 318-22 (1979)

MAICKEL, R.P.; WESTERMANN, E.O.; BRODIE, B.B.: Effects of reserpine and cold-exposure on pituitary-adrenocortical function in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 134, 167-72 (1961)

MARQUARDT, H.; SCHÄFER, S.G.: Lehrbuch der Toxikologie. BI-Wiss.-Verl., 673-4 (1994)

MATHISON, R.; DAVISON, J.S.; BEFUS, A.D.: Neuroendocrine regulation of inflammation and tissue repair by submandibular gland factors. Immunol. Today 15, 527-32 (1994)

McNICOL, A.M.; PENMAN, I.D.; DUFFY, A.E.: Age related variation in circadian rhythm of mitosis in the adrenal cortex of the male rat. Jour. Endocr. 120, 307-10 (1989)

MIYAMOTO, H.; MITANI, F.; MUKAI, K.; SUEMATSU, M.; ISHIMURA, Y.: Daily regeneration of rat adrenocortical cells: circadian and zonal variations in cytogenesis. Endocr. Res. 26(4), 899-904 (2000)

MORI, M.; TAKAI, Y.; KUNIKATA, M.: Review: Biologically active peptides in the submandibular gland – role of the granular convoluted tubule. Acta Histochem. Cytochem. 25, 325-41 (1992)

- MURAKAMI, K.; ISHIKAWA, T.; SHIMOSATO, T.; NOSHIRO, M.; HAYASHI, S.; OKUDA, K.: Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in rat submandibular gland. *Journ. Dent. Res.* 65 (1), 39-43 (1986)
- OISHI, Y.; OKUDA, M.; Takahashi, H.; Fujii, T.; Morii, S.: Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal rats: influences of sex, estrus cycle, and circadian change. *Anat. Rec.* 235(1) 111-20 (1993)
- OSIPOVA, L.A.; NEMLI, N.I.; ALEKSEEVA, T.A.; BYKOREZ, A.I.: Effect of sialadenectomy on hepatic carcinogenesis in rats induced by N-nitrosodiethylamine. *Eksp. Onkol.* 10(4), 18-20 (1988)
- OTTO, M.J.: Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung endogener Bedingungen der Kanzerogenese sowie zur Induktion endogener wachstumsstimulierender Faktoren in der Frühphase nach Applikation von genotoxischen und nichtgenotoxischen Kanzerogenen. Dissertation A, FSU-Jena (1991)
- PAWLIKOWSKI, M.; GRUSZKA, A.; MUCHA, S.; MELEN-MUCHA, G.: Angiotensins II and IV stimulate the rat adrenocortical cell proliferation acting via different receptors. *Endocr. Regul.* 35(3), 139-42 (2001)
- PITOT, H.C.: The role of receptors in multistage carcinogenesis. *Mutat. Res.* 333 (1-2), 3-14 (1995)
- POOL, B.L.; SCHMAEHL, D.: What's new in mutagenicity and carcinogenicity – status of short-term assay systems as tools in genetic toxicology and carcinogenesis. *Path. Res. Pract.* 182, 704-12 (1987)
- RAO, R.K.; THOMAS, D.W.; PEPPERL, S.; PORRECA, F.: Salivary epidermal growth factor plays a role in protection of ileal mucosal integrity. *Dig. Dis. Sci.* 42(10), 2175-81 (1997)
- ROBENS, J.F.; PIEGORSCH, W.W.; SCHUELER, R.L.: Methods of testing for carcinogenicity. In *Principles and Methods of Toxicology*. Chapter 9. Second Edition, Edit. By A.W. Hayes, Raven Press. Ltd. New York (1989)
- ROSOL, T.J.; YARRINGTON, J.T.; LATENDRESSE, J.; CAPEN, C.C.: Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29(1), 41-9 (2001)
- SAROSIEK, J.; McCALLUM, R.W.: Mechanisms of oesophageal mucosal defense. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 14(5), 701-17 (2000)
- SATO, M.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, Y.; DEGAWA, M.; HASHIMOTO, Y.: Selective induction of microsomal 2-AAF N-hydroxylation by dietary 2-AAF in rats. *Carcinogenesis* 2(7), 571-4 (1981)

SAVE, S.: Polychlorinated biphenyls (PCB's): mutagenicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 220, 31-47 (1998)

SCHEUMANN, G.F.; HEITMANN, P.; TEEBKEN, O.E.; MOSSINGER, E.; MELLON, S.H.;
PICHLMAYER, R.: Enzymatic properties of transplanted glomerulosa cells. *World. J. Surg.* 20(7), 933-8 (1996)

SCHMIDT, A.: Morphometrische Untersuchungen an der Adenohypophyse männlicher Ratten nach Kanzerogenbelastung. Promotion A. FSU-Jena 2001

SCHUETZLE, D.; RILEY, T.L.; PRATER, T.J.: Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulates. *Anal. Chem.* 54, 265-71 (1982)

SELYE, H.: The evolution of the stress concept. *American scientist* 61, 692-9 (1973)

SIVAK, A.: An evaluation of assay procedures for detection of tumor promoters. *Mutat. Res.* 98, 377-87 (1982)

SRINIVASAN, R.; Chang, W.W.L.: The development of the granular convoluted duct in the rat submandibular gland. *Anat. Rec.* 182, 29-40 (1975)

STACHOWIAK, A.; NUSSDOEFER, G.G.; MALENDOWICZ, L.C.: Proliferation and distribution of adrenocortical cells in the gland of ACTH- or dexamethasone-treated rats. *Histol. Histopathol.* 5, 25-9 (1990)

STERN, L.E.; FALCONE, R.A.; KEMP, C.J.; BRAUN, M.C.; ERWIN, C.R.; WARNER, B.W.:
Salivary epidermal growth factor and intestinal adaptation in male and female mice. *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G 871-7 (2000)

STEVENS, M.T.: An alternative method of the evaluation of organ weight experiments. *Toxicol.* 7, 275-81 (1977)

TANIGUCHI Y.; KOMINAMI R.; YASUTAKA S.; KAWARAI Y.: Proliferation and differentiation of pituitary corticotrophs during the fetal and postnatal period: a quantitative immunocytochemical study [In Process Citation]. *Anat. Embryol. (Berl.)* 201(4), 229-34 (2000)

THESSLAEFF, I.; VIINIKKA, L.; SAXEN, L.; LEHTONEN, E.; PERHEENTUPA, J.: The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. *Life. Sci.* 43(1), 13-8 (1988)

TISCHLER, A.S.; RUZICKA, L.A.; DONAHUE, S.R.; DE LELLIS, R.A.: Chromaffin cell proliferation in the adult rat adrenal medulla. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7; 439-48 (1989)

TISCHLER, A.S.; ZIAR, J.; DOWNING, J.C.; McCLAIN, R.M.: Sustained stimulation of rat adrenal chromaffin cell proliferation by reserpin. *Toxic. Appl. Pharmacol.* 135(2), 254-7 (1995)

TRAVIS, C.C.; SAULSBURY, A.W.; RICHTER PACK, S.A.: Prediction of cancer potency using a battery of mutation and toxicity data. *Mutagenesis* 5, no. 3, 213-9 (1990)

TRESGUERRES, J.A.; ARIZNAVARRETA, C.; GRANADOS, B.; ALVAREZ-VEGA, P.; FERNANDEZ-MATEOS, P.; GIL-LOYZAGA, P.; ALVAREZ-BUYLLA, R.: Parotid gland tissue is able partially to assume pituitary functions under the influence of hypothalamic factors: in vivo and in vitro studies. *J. Endocrinol.* 160(2), 205-16 (1999)

TROSKO, J.E.; CHANG, C.C.: Environmental carcinogenesis: an integrative model. *Q. Rev. Biol.* 53(2), 115-41 (1978)

UEBERGERG, H.; STOLTZ, W.; TRIEB, G.: Autoradiographic studies of the diurnal rhythm of the cell proliferation in the adrenal cortex of the rat. *Pathol. Res. Pract.* 173, 183-90 (1982)

WRIGHT, N.A.; APPLETON, D.R.: The metaphase arrest technique. A critical review. *Cell tissue Kinet.* 13, 643-63 (1980)

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:
Prof. Dr. med. habil. M. Danz,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- daß ich die gleiche, eine im wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Mohorn, den 05.12.2001

Lebenslauf

Name

Geburtstag und -ort

Familienstand

Nationalität

Angaben zur Person

Sascha Nikolov

13.12.1973 in K.- M.- Stadt; j. Chemnitz

verheiratet, ein Kind

deutsch

Schulbildung :

1980 – 1990

Polytechnische Oberschule in K.-M.-Stadt, j. Chemnitz

1990 – 1992

Erweiterte Oberschule und Abitur in Chemnitz

1992 – 1993

Zivildienst

Studium

10/1993 – 1995

Immatrikulation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
der Fachrichtung Humanmedizin

09/1995

Physikum

09/1996

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1998

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10 / 1998 – 09 / 1999

Praktisches Jahr

10 /1999

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

seit 1996

Arbeit an der Promotion zum Thema :

„Frühwirkungen genotoxischer und nichtgenotoxischer
Kanzero gene (Fluorene) auf die Zellteilung verschiedener
‘Nicht-Targetgewebe’ bei jungen männlichen Ratten“ als
Promotionsstudent am Institut für Anatomie der FSU-Jena

Jetzige Tätigkeit

seit 05/2001

Assistenzarzt für Chirurgie am Kreiskrankenhaus
Freiberg gGmbH

Mohorn, den 05.12.2001